

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés
Spécialité : Génie de Procédés et de l'Environnement

Par

Claudia CASTRO MARTINEZ

M. Sc. de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos
del Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

***Brettanomyces bruxellensis* :**
Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation.
Influence des facteurs environnementaux

Soutenue le 20 juin 2007 devant le jury composé de :

M.	Pierre STREHAIANO	Directeur de thèse
M.	Christian LARROCHE	Rapporteur
Mme.	Claudine CHARPENTIER	Rapporteur
M.	Cédric BRANDAM	Membre du jury
Mme.	Ma. Guadalupe AGUILAR USCANGA	Membre du jury
M.	Jean-François GILIS	Membre du jury

*Con todo mi amor y agradecimiento a
Claudia, Horacio, Horacio Jr.,
Yedy, Ana Carolina.,
y Pablo Emilio.*

*de su hija,
hermana,
y tia.*

Claudia

Aunque tropieza no desistas de tu propósito.

Shakespeare

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le résultat de presque quatre ans d'efforts et de travail, qui n'aurait jamais été achevée sans l'aide et le support de beaucoup de personnes. J'adresse mes plus sincères remerciements :

Au *Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse* à Basso Cambo où cette thèse a été réalisée, à son directeur *Monsieur Joël Bertrand* pour son chaleureux accueil dans cette unité de recherche,

Au *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT)*, organisme appartenant au gouvernement mexicain qui a assuré le financement de mon séjour et mes études en France,

Aux professeurs *Claudine Charpentier* et *Christian Larroche* pour avoir relu et avoir apporté leurs conseils sur ce travail de thèse. J'ai vraiment apprécié vos remarques pertinentes,

A *Monsieur Jean-François Gilis* pour avoir fait partie de mon jury et pour m'avoir inspirée grâce à son excellent travail de thèse,

A *Lupita Aguilar Uscanga* pour avoir suscité une telle motivation au cours de mes travaux de recherche dans la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos UNIDA-ITVeracruz, México. Merci d'avoir été membre du jury de thèse et merci pour votre amitié,

Je souhaiterais remercier chaleureusement *Monsieur Pierre Strehaiano* directeur du département de « Bio-procédés et Systèmes Microbiens (Bio-SyM) et mon directeur de thèse, pour son accueil, son encadrement et son soutien tout au long des ces années,

A mon petit chef, *Cédric Brandam*, pour toute ton aide quand tous les autres étaient absents ; malgré tout les problèmes de cette thèse, nous avons réussi. Merci, pour tout ce qui tu m'apportes. J'ai beaucoup appris professionnellement et personnellement grâce à toi. Un très grand merci à toi pour ce que tu es. Et que la modélisation continue.....,

Aux permanents du département de BioSym, spécialement *Marie-Line Délia et Patricia Taillandier*, merci pour votre aide et pour tous les échanges professionnels et personnels. Cela a été un honneur pour moi de travailler à vos cotés,

A l'équipe de doctorants du département de BioSym : *Nancy, Dominique, Claire, Sandrine, Maha, Huberson*. Je garderai toujours des souvenirs impérissables. Vous aurez une éternelle amie en moi, et je vous attends au Mexique ou n'importe où je me trouverai dans l'avenir. Jamais je n'oublierai ces week-ends et nuits au labo (attention Dominique!!! Ofelia est au labo),

A mes amis « latinos », *Isariebel, Alain, Luis Fernando, Ariadna, Michelle, Ivan et Edmé*, j'espère que notre amitié perdurera au-delà de notre éloignement. Je vous souhaite tout le bonheur du monde. Gracias por ser parte de esta aventura en Francia. Nunca olviden los buenos y muy buenos momentos que pasamos juntos,

A mis queridos amigos, *Sofia y Leonardo*, durante estos cuatro años, pasamos momentos increíbles y como olvidar esa frase Sof, “El valor de las cosas no está en el tiempo que duran, si no en la intensidad con que suceden...por eso existen momentos inolvidables, cosas inexplicables y personas incomparables...”. Gracias por su amistad,

A mis queridos amigos, *Denise y Tavo*, gracias por todo el apoyo y confianza que me brindaron a pesar de la gran distancia que nos separa. No fue fácil, pero llegamos al final. *Deny*, mis mejores deseos para tu tesis, ya falta poco,

A mis amigos y colegas, *Carlos y Saúl*, gracias por su apoyo incondicional, por creer en mí, y por su amistad. Nunca dudaron que terminaría esta tesis.....,

A *David*, a pesar de todo, te agradezco los buenos momentos que pasamos juntos, no cabe duda que contigo conocí caminos inexplorados y como aprendí...”Primero es la tesis” acuérdate,

A *Patricia (Pat)*, muchas gracias ser parte de esta historia, como tu dices pasamos tantas cosas juntas, como reímos, lloramos, nos divertimos y sobre todo como aprendimos. Te deseo mucho éxito en el futuro...y nos vemos en Venezuela y México. Gracias Amiga,

Enfin, deux grands merci spéciaux pour des êtres spéciaux : *Romy*, pour ton amitié, pour m’avoir aidée tout au long de ces années, comme oublier le 3 novembre 2005 (une nuit avant ma présentation), pour ton soutien dans les moments difficiles, et puis pour la correction de la thèse. *Felipe*, pour ton enseignement, ta patience et pour m’avoir fait confiance..... Merci !!!!

A l’ensemble des doctorants et permanents du LGC, que je n’ai pas encore cité. La mixité fait de nous un vrai laboratoire multiculturel qui m’a permis de m’enrichir scientifiquement, culturellement et personnellement.

Y termino este parte de la tesis, por supuesto, agradeciéndole a mi querida *familia*. Creo que no alcanzarían las palabras para expresarle todo mi amor y agradecimiento. Fue muy difícil, la peor y mejor prueba de mi vida creo...pero al final lo logramos papas y hermano. Esto va por ustedes. Muchas gracias.

A todos, muchas gracias, con todo mi cariño.

Claudia Castro Martínez

RESUME

Ce travail a porté sur l'analyse métabolique et cinétique de deux souches de *Brettanomyces*, levure de contamination des industries de fermentation alcoolique. Une des souches a été isolée d'une distillerie d'alcool de betterave, l'autre d'une unité de vinification. En s'appuyant sur la méthodologie des plans d'expérience, l'influence de facteurs de l'environnement de ces contextes industriels a été étudiée: pH, température, éthanol, dioxyde de soufre. Les cinétiques et stoechiométries observées ont pu être correctement représentées par un modèle associant loi logistique et formalisme de Luedeking et Piret. Les valeurs des paramètres du modèle de croissance sont fixées à partir des résultats du plan d'expérience. Enfin, par la méthode de l'analyse factorielle, nous avons pu proposer un schéma réactionnel valable pour les souches et les conditions opératoires testées.

Mots clé :

Brettanomyces bruxellensis, métabolisme, cinétique, modélisation, température, pH, éthanol, SO₂.

ABSTRACT

This work has dealt with the metabolic and kinetic analyses of two strains of *Brettanomyces*, a contamination yeast found in alcoholic fermentation industries. One of these two strains was isolated from a beet alcohol distillery and the other one from a winemaking unit. Leaning upon the experimental plan methodology, the influence of the industrial environment factors has been studied: pH, temperature ethanol and sulphur dioxide concentration. The kinetics and stoichiometries observed were accurately represented by a model associating the Logistic law and Luedeking and Piret formalism. The parameters values of the growth model were settled from the experimental plan results. Finally, using the factorial analysis method, we were able to propose a reactional scheme valid for the tested strains and operative conditions.

Key words:

Brettanomyces bruxellensis, metabolism, kinetic, model, temperature, pH, ethanol, SO₂.

Tables des Matières

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Introduction sur la contamination microbienne dans l'industrie	7
1.1. Elaboration du vin	8
1.1.1. Les étapes de l'élaboration du vin	8
1.1.2. Principaux paramètres du procédé	11
1.1.3. Biochimie de la production du vin	11
1.1.4. Contamination microbienne lors de l'élaboration du vin	12
1.2. Production d'alcool industriel (distilleries)	17
1.2.1. Procédés de production	18
1.2.2. Principaux paramètres du procédé	19
1.2.3. Contamination microbienne dans l'industrie de production d'alcool	19
1.3. Le genre <i>Brettanomyces</i>	21
1.3.1. Taxonomie et morphologie de <i>Brettanomyces</i>	21
1.3.2. Aspects physiologiques et métaboliques	22
1.3.3. Besoins nutritionnels	24
1.4. Mécanismes de répression catabolique	27
1.4.1. Effet Pasteur	27
1.4.2. Effet Crabtree	28
1.4.3. Effet Custer	29
1.5. Influence des paramètres environnementaux sur la croissance	29
1.5.1. Effet de la température	29
1.5.2. Effet du pH	31
1.5.3. Rôle de l'oxygène	32

1.6. Effet des produits de fermentation et du dioxyde de soufre	35
1.6.1. Effet de l'éthanol	35
1.6.2. Effet de l'acide acétique	37
1.6.3. Effet du dioxyde de soufre	38
1.7. Modélisation du métabolisme levurien	40
1.7.1. Croissance microbienne en culture discontinue (batch)	42
1.7.1.1. <i>Les étapes de la croissance</i>	42
1.7.1.2. <i>Phase de latence</i>	44
1.7.2. Modélisation des cinétiques de croissance	47
1.7.3. Modélisation de la formation des produits	49
1.7.4. Modèles de la microbiologie prédictive: le plan d'expériences	51
1.7.5. L'analyse factorielle de données pour la construction d'un modèle stoechio-cinétique	53
1.7.5.1. <i>Formulation du problème</i>	54
1.7.5.2. <i>L'analyse factorielle en fermentation</i>	57
1.7.5.3. <i>Méthode d'analyse factorielle appliquée à la recherche de stœchiométries de réaction</i>	58
1.8. Conclusions de l'étude bibliographique	60
 CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES	 63
2.1. Les microorganismes	65
2.2. Les milieux de culture	65
2.2.1 Milieu de conservation	66
2.2.2 Milieu de fermentation	66
2.2.2.1 <i>Milieu synthétique minimum (chapitre 4 et 5)</i>	66
2.2.2.2 <i>Milieu synthétique type vin (chapitre 3)</i>	66
2.3. Déroulement des fermentations	68
2.3.1 Pré-culture	68
2.3.2 Cultures en batch	68
2.3.2.1 <i>Erlenmeyer</i>	69
2.3.2.2 <i>Fermenteur</i>	69
2.3.3 Protocole de prélèvement des échantillons	72
2.4. Les méthodes analytiques	73
2.4.1 Analyse de la biomasse	73

2.4.1.1 Spectrophotométrie (Turbidimétrie)	73
2.4.1.2 Méthode gravimétrique (Poids sec)	73
2.4.1.3 Numération cellulaire	75
2.4.1.4 Pourcentage de viabilité	76
2.4.2 Analyse des sucres	77
2.4.2.1 Dosage par méthode enzymatique (YSI)	77
2.4.2.2 Dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC)	77
2.4.3 Analyse de l'éthanol	78
2.4.4 Analyse de l'acide acétique	78
2.4.5 Dosage du glycérol	79
2.4.6 Dosage de l'azote par méthode enzymatique	79
2.4.7 Reproductibilité des méthodes utilisées	80
2.5. Analyseur de gaz (CO₂ et O₂)	81
2.6. Calcul des paramètres cinétiques	82
2.7. Lissage des données expérimentales	83
2.8. Plan d'expériences	84
 CHAPITRE 3. ETUDE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE DE <i>BRETTANOMYCES</i> EN VINIFICATION	 87
 3.1. Résistance des souches <i>Brettanomyces</i> à la concentration initiale en éthanol	 89
 3.2. Effet des paramètres environnementaux de vinification sur la croissance d'un souche de <i>Brettanomyces</i> (B2)	 96
3.2.1. Essais préliminaires	97
3.2.2. Réalisation du plan d'expériences	99
3.2.3. Application d'un modèle mathématique pour la croissance de <i>Brettanomyces</i> .	108

CHAPITRE 4. ETUDE CINETIQUE ET METABOLIQUE DES SOUCHES DU GENRE <i>BRETTANOMYCES</i>	113
4.1. Influence de la température	115
4.1.1. Effet sur la croissance	116
4.1.1.1. Souche distillerie (B5d)	116
4.1.1.2. Souche vin (B2)	119
4.1.1.3. Calcul de l'énergie d'activation et du coefficient Q_{10}	120
4.1.2. Effet sur la consommation et sur la production	123
4.1.2.1. Souche distillerie (B5d)	123
4.1.2.2. Souche vin (B2)	126
4.1.3. Analyse cinétique et modélisation	128
4.1.4. Conclusions	138
4.2. Influence du pH (souche distillerie B5d)	140
4.2.1. Effet sur la croissance	141
4.2.2. Effet sur la consommation et sur la production	143
4.2.3. Effet du pH et concentration d'acide acétique non dissocié dans la culture	146
4.2.4. Analyse cinétique	148
4.2.5. Conclusions	151
CHAPITRE 5. ETABLISSEMENT D'UN SCHEMA REACTIONNEL POUR LE METABOLISME DU GLUCOSE ET DE L'ETHANOL CHEZ <i>BRETTANOMYCES</i>	153
5.1. Bilans matière	155
5.1.1 Calcul de la composition du gaz en sortie du fermenteur	155
5.1.2. Bilan carbone	159
5.1.3. Bilan azote	162
5.2. Proposition du schéma réactionnel	164
5.2.1. Méthode appliquée pour déterminer le schéma réactionnel	164
5.2.2. Proposition d'un schéma réactionnel	167

5.2.3. Formulation du problème de minimisation et stratégie de résolution	171
5.2.4. Comparaisons entre données expérimentales et données simulées	175
5.2.5. Analyse des avancements de réactions	178
5.3. Conclusion	182
 CONCLUSION GENERALE	 183
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 189
 ANNEXES	 207

*Liste des figures
et
des tableaux*

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I	PAG.
Figure 1.1. Procédé d'élaboration du vin rouge	10
Figure 1.2. Contamination d'une unité de fermentation alcoolique par <i>Brettanomyces</i> (De Miniac, 1989).	20
Figure 1.3. Schéma récapitulatif des voies métaboliques (respiration et fermentation) et des voies métaboliques annexes pouvant conduire à la production de sous-produits.	24
Figure 1.4. Les différentes formes de l'anhydride sulfureux.	38
Figure 1.5. Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (batch) décrites par Buchanan (1918).	44
Figure 1.6. Profil de croissance typique pour des cellules après pré-incubation, à température constante.	45
Figure 1.7. Comparaison entre le temps de latence conventionnel (____) et la définition proposé par Buchanan et Cygnarowics (1990) en utilisant la troisième dérivé de $\ln X$ (-----).	46
Figure 1.8. Exemples de cinétiques de croissance et de production pour une fermentation en batch : (A) production associée à la croissance, (B) production dissociée de la croissance et (C) production partiellement associée à la croissance.	51
 CHAPITRE II	
Figure 2.1. Préparation de l'inoculum en deux étapes successives.	68
Figure 2.2. Fermenteur Sétric de type « SET 2 ».	70
Figure 2.3. Fermenteur « BioFlo 110 » (New Brunswick).	71
Figure 2.4. Protocole de prélèvement des échantillons.	72
Figure 2.5. Corrélation entre le poids-sec et la densité optique à 620 nm pour <i>B. bruxellensis</i> isolés de la distillerie (B5d).	74

Figure 2.6	Corrélation entre le poids-sec et la densité optique à 620 nm pour <i>B. bruxellensis</i> vin (B2).	74
Figure 2.7.	Schéma de la cellule de THOMA.	75
Figure 2.8.	Comparaison entre deux méthodes pour doser le glucose (HPLC et YSI).	78
Figure 2.9.	Reproductibilité des données expérimentales. Expériences à pH non régulé.	80
Figure 2.10.	Schéma de dispositif expérimental pour la détermination des concentrations de dioxyde de carbone et d'oxygène.	82

CHAPITRE III

Figure 3.1.	Profil cinétique de croissance à différents teneurs en éthanol en 5 souches de <i>Brettanomyces</i> .	90
Figure 3.2.	Comparaison de la concentration de biomasse maximale en fonction de différentes teneurs en éthanol pour 5 souches de <i>Brettanomyces</i> (A) et en fonction de différentes souches pour 4 teneurs en éthanol différentes (B).	91
Figure 3.3.	Concentration de glucose (A) et de fructose (B) résiduel à différentes teneurs en éthanol pour 5 souches de <i>Brettanomyces</i> .	92
Figure 3.4.	Comparaison des souches <i>Brettanomyces</i> en fonction de la teneur en éthanol et en la production d'acide acétique.	93
Figure 3.5.	Evolution au cours de temps des concentrations en biomasse, en glucose, en fructose, en acide acétique et en glycérol pour <i>Brettanomyces</i> B2 dans un milieu synthétique vin à 10% d'éthanol (v/v).	95
Figure 3.6.	Effet du pH à différentes teneurs en éthanol et températures. (A) 25°C, 7% v/v d'éthanol, (B) 18°C, 7% v/v d'éthanol.	98
Figure 3.7.	Effet des paramètres environnementaux sur la concentration de biomasse maximale (X_{max}).	103
Figure 3.8.	Effet des paramètres environnementaux sur le taux spécifique maximal de croissance (μ_{max}).	104
Figure 3.9.	Effet des paramètres environnementaux sur la phase de latence (λ).	105

Figure 3.10.	Comparaison des valeurs expérimentales de biomasse (symboles), et des valeurs prédites par le modèle (lignes). (A) Expériences à 7% d'éthanol v/v avec 0.16 mg/L de SO ₂ moléculaire et à des températures de 25 et 18°C. (B) Expériences à 18°C, avec 0.39 mg/L de SO ₂ moléculaire et à une concentration d'éthanol de 7 et 10% v/v. (C) Expériences avec 0.39 et 0.16 mg/L de SO ₂ moléculaire initiale, à une température de 25°C, et 10% d'éthanol v/v.	110
 CHAPITRE IV		
Figure 4.1.	(A) Concentration en biomasse et (B) pourcentage de viabilité à différentes températures pour la souche <i>B. bruxellensis</i> (B5d).	116
Figure 4.2.	(A) Vitesse spécifique de croissance et (B) vitesse spécifique maximale de croissance à différentes températures (Application de l'équation d'Arrhenius) pour la souche <i>B. bruxellensis</i> (B5d).	118
Figure 4.3.	(A) Effet de la température sur la biomasse. (B) Pourcentage de viabilité à différentes températures souche <i>B. bruxellensis</i> (B2).	119
Figure 4.4.	Evolution de la vitesse spécifique de croissance à différentes températures chez <i>B. bruxellensis</i> (B2).	120
Figure 4.5.	Consommation de glucose à différentes températures pour <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (B5d).	124
Figure 4.6.	(A) Evolution de l'éthanol au cours du temps et (B) profil de l'acide acétique à différentes températures pour la souche <i>B. bruxellensis</i> (B5d).	125
Figure 4.7.	Profil de consommation de glucose à différentes températures pour la souche <i>B. bruxellensis</i> (B2).	126
Figure 4.8.	(A) Evolution de l'éthanol au cours de temps et (B) profil cinétique de l'acide acétique à différents températures pour la souche <i>B. bruxellensis</i> (B2).	127
Figure 4.9.	Représentation de la croissance par le modèle Logistique aux différentes températures. (Souche distillerie B5d).	129
Figure 4.10.	Représentation de la concentration de biomasse par le modèle Logistique à différentes températures. (Souche vin B2).	130

Figure 4.11.	Concentration d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en biomasse à différentes températures. (Souche distillerie B5d).	131
Figure 4.12.	Concentration d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en biomasse à différentes températures. (Souche vin B2).	131
Figure 4.13.	Représentation de la concentration de l'éthanol par le modèle de Luedeking et Piret à différentes températures. (Souche distillerie B5d).	133
Figure 4.14.	Représentation de la concentration d'acide acétique par le modèle de Luedeking et Piret à différentes températures. (Souche distillerie B5d).	134
Figure 4.15.	Représentation de la concentration d'éthanol et d'acide acétique par le modèle de Luedeking et Piret à différentes températures. (Souche vin B2).	135
Figure 4.16.	Production d'éthanol en fonction de la production d'acide acétique.	137
Figure 4.17.	Evolution de la valeur du pH au cours de la culture de <i>B. bruxellensis</i> (B5d).	141
Figure 4.18.	(A) profils de croissance et (B) pourcentage de viabilité aux différentes conditions de pH pour <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .	142
Figure 4.19.	Profils de la consommation en glucose à différentes conditions de pH.	143
Figure 4.20.	(A) profils de production d'éthanol, (B) profils de production d'acide acétique pour différentes conditions de pH pour <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .	144
Figure 4.21.	Vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du temps à pH contrôlé et non contrôlé.	145
Figure 4.22.	Représentation de la concentration de biomasse par le modèle Logistique pour différentes conditions de pH (souche <i>B. bruxellensis</i> B5d).	148
Figure 4.23.	Concentrations d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en biomasse pour différentes conditions de pH (souche <i>B. bruxellensis</i> B5d).	149
Figure 4.24.	Représentation de la concentration d'éthanol et d'acide acétique par le modèle de Luedeking et Piret pour différentes conditions de pH. (<i>B. bruxellensis</i> B5d).	150

CHAPITRE V

Figure 5.1.	Comparaison de l'éthanol évaporé mesuré et calculé au cours du temps.	159
Figure 5.2.	Bilan carbone instantané (A) souche <i>B. bruxellensis</i> (B2) à 30°C (B) souche <i>B. bruxellensis</i> (B5d) à 30°C, pH contrôlé.	160
Figure 5.3.	Relation entre la consommation d'éthanol et la production d'acide acétique à différentes conditions de pH (<i>B. bruxellensis</i> B5d).	162
Figure 5.4.	Evolution de la consommation d'azote assimilable au cours de la fermentation à différentes conditions de pH en <i>B. bruxellensis</i> (B5d).	163
Figure 5.5.	Représentation de la méthode utilisée pour établir le schéma réactionnel.	167
Figure 5.6.	Schéma réactionnel suivi par <i>B. bruxellensis</i> pour la consommation du glucose (phase 1).	169
Figure 5.7.	Métabolisme suivi par <i>B. bruxellensis</i> pour la consommation du glucose (phase 1).	170
Figure 5.8.	Schéma réactionnel suivi par <i>Brettanomyces</i> pour la consommation d'éthanol (phase 2).	171
Figure 5.9.	Comparaison entre données expérimentales et données calculées pour <i>B. bruxellensis</i> vin (B2) à différentes températures à partir du schéma réactionnel.	176
Figure 5.10.	Comparaison entre données expérimentales et données calculées pour <i>Brettanomyces bruxellensis</i> distillerie à différentes températures (B5d).	177
Figure 5.11.	Comparaison entre données expérimentales et données calculées pour <i>Brettanomyces bruxellensis</i> distillerie (B5d) à différentes conditions de pH.	178
Figure 5.12.	Avancements de réactions impliquées dans le métabolisme de <i>B. bruxellensis</i> vin (B2) à 30°C.	179

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I	PAG.
Tableau I.1. Composés principaux du vin.	12
Tableau I.2. Traitements utilisés pour le contrôle de <i>Brettanomyces</i> .	15
Tableau I.3. Procédés de fabrication d'alcool.	18
Tableau I.4. Classification des micro-organismes par la température (Prescott et coll., 1995).	30
Tableau I.5. Exemples de l'application de plan d'expériences en différents micro-organismes.	52
 CHAPITRE II	
Tableau II.1. Pourcentage d'erreur pour chaque composé et différentes méthodes	81
 CHAPITRE III	
Tableau III.1. Comparaison des vitesses spécifiques maximales de croissance pour les 5 souches à différentes concentrations en éthanol.	91
Tableau III.2. Définition des différents niveaux des variables de la matrice d'expériences	100
Tableau III.3. Effets des environnementaux sur la phase de latence (λ)	101
Tableau III.4. Comparaison des effets des facteurs environnementaux sur le développement de <i>Brettanomyces</i> . Gerbaux et coll. (2000) et Castro (2007)	107
 CHAPITRE IV	
Tableau IV.1 Comparaison de l'énergie d'activation et la valeur du Q_{10} sur la croissance de différentes levures	121
Tableau IV.2 Comparaison de la valeur du Q_{10} sur levures <i>B. bruxellensis</i> .	123
Tableau IV.3 Valeurs des paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret à différentes températures et ses coefficient de corrélation. (Souche distillerie B5d)	136

Tableau IV.4	Valeurs des paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret à différentes températures et ses coefficients de corrélation. (Souche vin B2)	137
Tableau IV.5	Concentration d'acide acétique dissocié et non dissocié ($[A^-]$, $[AH]$) au cours de la fermentation à différentes conditions de pH.	147
Tableau IV.6	Tableau IV.6 Valeurs des paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret pour différentes conditions de pH et ses coefficients de corrélation.	150

CHAPITRE V

Tableau V.1	Bilan carbone global pour les différentes conditions opératoires et les différentes souches.	161
Tableau V.2	Récapitulatif des coefficients stœchiométriques obtenus pour chaque série d'expériences.	173
Tableau V.3	Comparaison des avancements de réaction finaux à différentes températures en <i>B. bruxellensis</i> distillerie (B5d).	180
Tableau V.4	Comparaison des avancements de réaction finaux à différentes températures en <i>B. bruxellensis</i> vin (B2).	181
Tableau V.5	Comparaison des avancements de réaction finaux à différentes conditions de pH en <i>B. bruxellensis</i> distillerie (B5d).	181

NOMENCLATURE

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
B1 : Souche *Brettanomyces bruxellensis* isolé du vin B1
B2 : Souche *Brettanomyces bruxellensis* isolé du vin B2
B4 : Souche *Brettanomyces bruxellensis* isolé du vin B4
B5d : Souche *Brettanomyces bruxellensis* isolé de la distillerie B5d
CO₂ : Dioxyde de carbone
DMDC : Diméthylcarbonate
DO : Densité optique
EMP : Voie d'Embden Meyerhof Parnas
FA : Fermentation alcoolique
FML : Fermentation malo-lactique
HPLC : Chromatographie liquide haute pression
LGC : Laboratoire de Génie Chimique
N-NH₄ : azote ammoniacal
O₂ : Oxygène
SO₂ : dioxyde de soufre
SO_{2m} : dioxyde de soufre moléculaire
SSF : Procédé de saccharification et fermentation simultané
TP1 : Souche *Brettanomyces bruxellensis* isolé du vin TP1
VNC : Viable Non Cultivable.
Y_{E/S} : rendement en éthanol produit par rapport au substrat (glucose) consommé
YSI : Yellow Spring Instrument
Y_{X/S} : rendement en biomasse produite par rapport au substrat (glucose) consommé

LETTRES LATINES

% V : Pourcentage de viabilité
% d'erreur : Pourcentage d'erreur
[A⁻] : Forme dissociée de l'acide acétique
[AH] : Forme non dissociée de l'acide acétique
[At] : Concentration d'acide acétique total
°C : Degré centigrades
D [n, nc] : Matrice des variations de rétentions molaires
E_a : Energie d'activation de la croissance microbienne
EOH : Ethanol
K₁ : Vitesse de réaction la plus basse.
K₂ : Vitesse de réaction la plus élevée
K_{La} : Coefficient de transfert d'oxygène.
Ks : Constante d'affinité
M : Molaire. 1 M = 1 mol/L, 1 mM = 1 mmol/L.
N [n, nc] : Matrice des stœchiométries de réaction
nr : Le nombre de réactions.

P : Produit

P: pression bar

pKa : Constante de dissociation de l'acide acétique

Q₁₀ : Paramètre qui représente l'augmentation de la vitesse de réaction quand il y a une augmentation de la température de 10°C.

R : Réaction

R² : Coefficient de corrélation

S : Substrat (glucose)

T : Température

T₁ : Température de la culture la plus basse

T₂ : Température de la culture la plus élevée

v/v : Volume à volume.

v_r (t) : Vitesse de la réaction r (définie par rapport au constituant clé tel que $\gamma_c^r = 1$).

X : Biomasse

X_{max} : Biomasse maximale

X₀ : Biomasse initiale

Y [n, nr] : Matrice des avancements de réaction

LETTRES GRECQUES :

μ : Vitesse spécifique de croissance

μ_{max} : Vitesse spécifique de croissance maximale

μ₀ : Facteur pré-exponentiel

t : Temps

vp : Vitesse spécifique de formation de produit

α : Constante associée à la vitesse de croissance

β : Constante associée à la concentration en biomasse

γ_e^r : Coefficient stœchiométrique du constituant e dans la réaction r.

λ : Latence

v_{acé1} : Coefficient stœchiométrique de l'acide acétique pour la phase 1 (consommation du glucose)

v_{acé2} : Coefficient stœchiométrique de l'acide acétique pour la phase 2 (consommation de l'éthanol)

v_{bio1} : Coefficient stœchiométrique de la biomasse pour la phase 1 (consommation du glucose)

v_{bio2} : Coefficient stœchiométrique de la biomasse pour la phase 2 (consommation de l'éthanol)

v_{C1} : Coefficient stœchiométrique du carbone pour la phase 1 (consommation du glucose)

v_{C2} : Coefficient stœchiométrique du carbone pour la phase 2 (consommation de l'éthanol)

v_{etha1} : Coefficient stœchiométrique de l'éthanol pour la phase 1 (consommation du glucose)

v_{H1} : Coefficient stœchiométrique de l'hydrogène pour la phase 1 (consommation du glucose)

v_{H2} : Coefficient stœchiométrique de l'hydrogène pour la phase 2 (consommation de l'éthanol)

v_{N1} : Coefficient stœchiométrique de l'azote pour la phase 1 (consommation du glucose)

v_{N2} : Coefficient stœchiométrique de l'azote pour la phase 2 (consommation de l'éthanol)
 v_{O1} : Coefficient stœchiométrique de l'oxygène pour la phase 1 (consommation du glucose)
 v_{O2} : Coefficient stœchiométrique de l'oxygène pour la phase 2 (consommation de l'éthanol)

Introduction Générale

INTRODUCTION

Dans un contexte industriel, les milieux de fermentation ne sont pas toujours stériles et les conditions opératoires rendent souvent difficile, voire impossible, le travail aseptique. La flore indigène demeure une source fréquente d'accidents de fermentation qui nuisent à la qualité du produit final pouvant le rendre impropre à la consommation. En particulier, le cas de contaminations d'origine levurienne pose un grave problème. Les fermentations de jus de betterave ou de mélasses de sucrerie sont de plus en plus le siège de contaminations par des levures du genre *Brettanomyces*. Le développement de ces levures dans le milieu de fermentation a des lourdes conséquences économiques. En vinification, une contamination par *Brettanomyces sp.* peut avoir des conséquences tragiques. Ces levures sont en effet responsables des caractères phénolés dans les vins rouges et sont capables de supprimer les arômes fruités au profit de perceptions animales (« odeur d'écurie » et « de sueur de cheval »), rendant le produit impropre ou désagréable à la consommation.

A ce jour, les études menées pour essayer de connaître les causes de contamination sont insuffisantes et parfois contradictoires. Ainsi, il apparaît souhaitable de connaître les mécanismes qui provoquent la contamination par ce genre de levure, pour pouvoir les prévenir ou les combattre.

Cette thèse s'inscrit dans un projet global au sein du Laboratoire de Génie Chimique (LGC) dans le département BioSym. Les objectifs scientifiques affichés de ce projet, peuvent être divisés en 3 axes :

- (1) Isolement, identification, contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge.
- (2) Etude des paramètres environnementaux sur la cinétique et le métabolisme de *Brettanomyces* et modélisation de la croissance.
- (3) Etude de la production des éthylphénols par *Brettanomyces* à partir de l'acide p-coumarique.

Chacune de ces recherches ont une mission bien définie pour au final mieux connaître et comprendre les conditions de développement de cette levure et pouvoir établir quelques solutions aux problèmes de contaminations dans l'industrie.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux paramètres environnementaux (axe 2) favorisant le développement de *Brettanomyces* dans des conditions œnologiques. Or, des études précédentes ont mis en évidence que plusieurs facteurs affectent fortement la fermentation alcoolique avec comme conséquence la qualité finale du produit (Ribéreau-Gayon et al, 2000). Ainsi, nous allons étudier l'influence du pH, du dioxyde de soufre (SO₂), de l'éthanol et de la température sur le développement de *Brettanomyces*.

Les contaminations ayant été détectées essentiellement sur des vins finis, nous nous placerons tout d'abord dans des conditions proches de ce milieu. Les souches étudiées seront issues d'isolats provenant de vins des caves de Buzet. D'autre part, un milieu minimum sera utilisé pour étudier le métabolisme et la cinétique de *Brettanomyces* vis-à-vis de la température et du pH. Pour ce travail, deux souches seront étudiées; la même que celle des conditions précédents et une souche isolée d'une distillerie de fermentation d'alcool.

Dans le premier chapitre « *analyse bibliographique* » nous traiterons la connaissance théorique sur les problèmes de contamination en vinification et dans la production d'alcool industriel. De plus, une présentation générale du genre *Brettanomyces* sera abordée (aspects physiologiques et métaboliques). Ensuite, nous présenterons l'effet des différents facteurs environnementaux sur la croissance de levures. La dernière partie de ce chapitre est consacrée aux différents modèles mathématiques du métabolisme levurien.

Le second chapitre, « *matériels et méthodes* » présente les différentes souches utilisées, ainsi que les diverses techniques mises en oeuvre pour les expérimentations réalisées. De plus, les différents outils mathématiques appliqués aux données issues des essais réalisées sont détaillés dans cette partie.

La partie « **résultats et discussions** » comprend les chapitres 3, 4 et 5. Le troisième chapitre présente la synthèse des résultats expérimentaux obtenus au cours du travail de thèse. Tout d'abord, nous montrons l'effet des paramètres environnementaux sur la croissance de *Brettanomyces*. La méthodologie appliquée est du type plan d'expériences afin de dégager rapidement quels sont les paramètres les plus influents sur le développement de la population. Ensuite, un modèle de type loi logistique a été utilisé afin de modéliser la croissance de cette levure et représenter son évolution au cours de temps.

Dans le **chapitre 4**, il s'agit de comprendre le métabolisme de la levure dans diverses conditions opératoires (température et pH). Dans un premier temps, nous avons réalisés une étude métabolique et cinétique sur la croissance, la consommation de substrat et la production de métabolites de fermentation chez *Brettanomyces*. Le modèle logistique et le formalisme de Luedeking et Piret ont été appliqués afin d'étudier la cinétique de cette levure. **Le chapitre 5** est orienté vers un modèle de connaissance du type stoechiocinétique grâce à la mesure des effluents gazeux qui ont permis la réalisation de bilans matière complets sur les fermenteurs. A partir de l'analyse factorielle, un schéma réactionnel est proposé et ses coefficients stoechiométriques sont déterminés par résolution d'un problème d'optimisation sous contraintes, de même que les avancements de réactions décrivant la dynamique du système.

La dernière partie du mémoire concerne les « **conclusions et les perspectives** » de ce travail. Nous rappellerons les principaux résultats obtenus, ainsi que les possibles voies envisagées pour la suite des études sur *Brettanomyces*.

Chapitre I
Analyse Bibliographique

CHAPITRE I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction sur la contamination microbienne dans l'industrie

La contamination microbienne peut être définie comme la présence de microorganismes non désirables dans un processus ce qui provoque des altérations sur la population mise en œuvre ou sur les produits de la fermentation. Ce problème est la cause d'accidents de fermentation, pendant lesquels la production d'alcool et la levure sont fortement affectées par la présence de bactéries, de levures sauvages ou de champignons. Cependant, dans le cas de contaminations bactériennes, le contrôle est relativement facile grâce à l'emploi d'agents antibactériens tels que la pénicilline ou le fluorure de sodium (De Miniac, 1988). En revanche, les contaminations occasionnées par des levures posent de graves problèmes dans l'industrie et à ce jour il n'existe que peu de solutions pour les combattre.

Depuis 20 ans les accidents de contamination sont toujours fréquents dans les différents domaines de l'industrie agro-alimentaire tels que:

- ⇒ La fabrication de produits laitiers
- ⇒ La production de bière
- ⇒ L'élaboration du vin et,
- ⇒ La production d'alcool

Une contamination microbienne peut modifier les propriétés physiques ou chimiques, l'aspect et les propriétés sensorielles du produit final.

Dans les procédés fermentaires, les étapes possibles de contamination par des micro-organismes se situent:

- ⇒ Dans la phase pré-fermentaire : c'est-à-dire pendant la préparation de la matière première
- ⇒ Pendant la fermentation
- ⇒ Dans la phase post-fermentaire : au cours du stockage.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux contaminations affectant les industries de l'élaboration du vin et de la production d'alcool dans lesquelles elles ont induit ces

dernières années des pertes économiques importantes. Tout d'abord seront décrits les procédés de fabrication du vin et de production d'alcool à usage industriel. Ensuite seront exposés les problèmes de contamination rencontrés dans les procédés de fermentations alcooliques en nous attachant principalement à ceux liés à la levure *Brettanomyces*.

1.1. Elaboration du vin

L'histoire du vin est aussi ancienne que l'histoire de l'humanité. Au XIX^e siècle le vin était considéré comme une boisson énergétique et souvent consommé lorsque l'eau n'était pas vraiment potable. En Europe, selon la définition légale, « *le vin est le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale ou partielle, de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisins* ».

Le vin est donc une solution d'alcool dans l'eau qui contient essentiellement des sucres, tels que le glucose et le fructose; du glycérol; des acides organiques: malique, citrique, tartrique, acétique, lactique et succinique et des composés phénoliques: tannins, anthocyanes; et plus de 200 composés à l'état de trace qui participent fortement à la qualité organoleptique du vin.

1.1.1. Les étapes de l'élaboration du vin.

Dans cette partie nous présenterons les opérations principales de la fabrication du vin utilisés dans presque tous les vignobles afin de nous permettre d'avoir une vue d'ensemble de la vinification en rouge (**figure 1.1**).

a) Etape pré-fermentaire

La vendange : c'est la période de récolte du raisin avant son arrivée au chai. Les traitements mécaniques de la vendange sont (Delteil, 1995):

⇒ *Le foulage* : qui consiste à faire éclater les grains de raisin. Le but de cette opération est de libérer le maximum de jus, de mettre en contact les levures situées sur la pellicule et le moût très sucré et finalement d'obtenir un bonne

macération de la vendange afin de dissoudre les matières colorantes de la pellicule et les activateurs de fermentation de la prune.

⇒ *L'égrappage* : cette opération est combinée avec le foulage et consiste à séparer la rafle (partie ligneuse de la grappe) du reste de la vendange. Avec cette opération on obtient des vins moins astringents par l'élimination des tanins herbacés et une augmentation légère des degrés alcooliques.

⇒ *Le sulfitage* est aussi une opération pré-fermentaire et consiste en l'addition d'anhydride sulfureux (SO_2) ce qui va permettre d'assurer une protection vis-à-vis des micro-organismes indésirables et de protéger le moût des oxydations.

Après ces opérations pré-fermentations on passe à la fermentation alcoolique et à la macération qui sont les étapes essentielles de la vinification.

b) Etape fermentaire

La fermentation alcoolique (FA) est un phénomène naturel au cours duquel les sucres du raisin se transforment en alcool sous l'action des levures. Cette transformation s'accompagne d'un dégagement de gaz carbonique (CO_2). La fermentation alcoolique dure en moyenne de 4 à 21 jours. Durant cette période les matières colorantes et les éléments tanniques contenus dans la peau diffusent dans le moût de fermentation (macération).

Ensuite, on procède à l'écoulage ou soutirage des cuves pour finir la macération. Le marc (ensemble des parties solides du raisin) et le moût sont séparés. Le moût est le vin de goutte, et le marc, après pressurage, donne le vin de presse (riche en tanins et pigments). A ce stade, une seconde fermentation à lieu, la fermentation malo-lactique (FML). Cette fermentation consiste à transformer l'acide malique en acide lactique (décarboxylation) par l'action des bactéries lactiques. La FML va assurer une diminution de l'acidité du vin et concourir à sa stabilité microbiologique. Par ailleurs la formation de certaines molécules aromatiques va améliorer les caractères organoleptiques du vin.

c) Etape post-fermentaire

Après de fermentation malo-lactique, le vin passe en élevage. Cette étape est essentielle dans l'élaboration du produit final. Son but est principalement de purifier le vin de ses

impuretés par les opérations de soutirage, ouillage, de faire vieillir le vin, de faire évoluer ses arômes, de compléter la structure du vin par l'apport de tannins externes, et finalement de préparer les assemblages finaux afin de rendre le vin « consommable » lors de la mise en bouteille. La durée de l'élevage est très variable selon l'origine, la nature et la qualité du vin considéré (Ribéreau-Gayon et coll., 1998). Pendant et au terme de l'élevage, le vin est filtré et clarifié pour éliminer les particules en suspension avant d'être mis en bouteille.

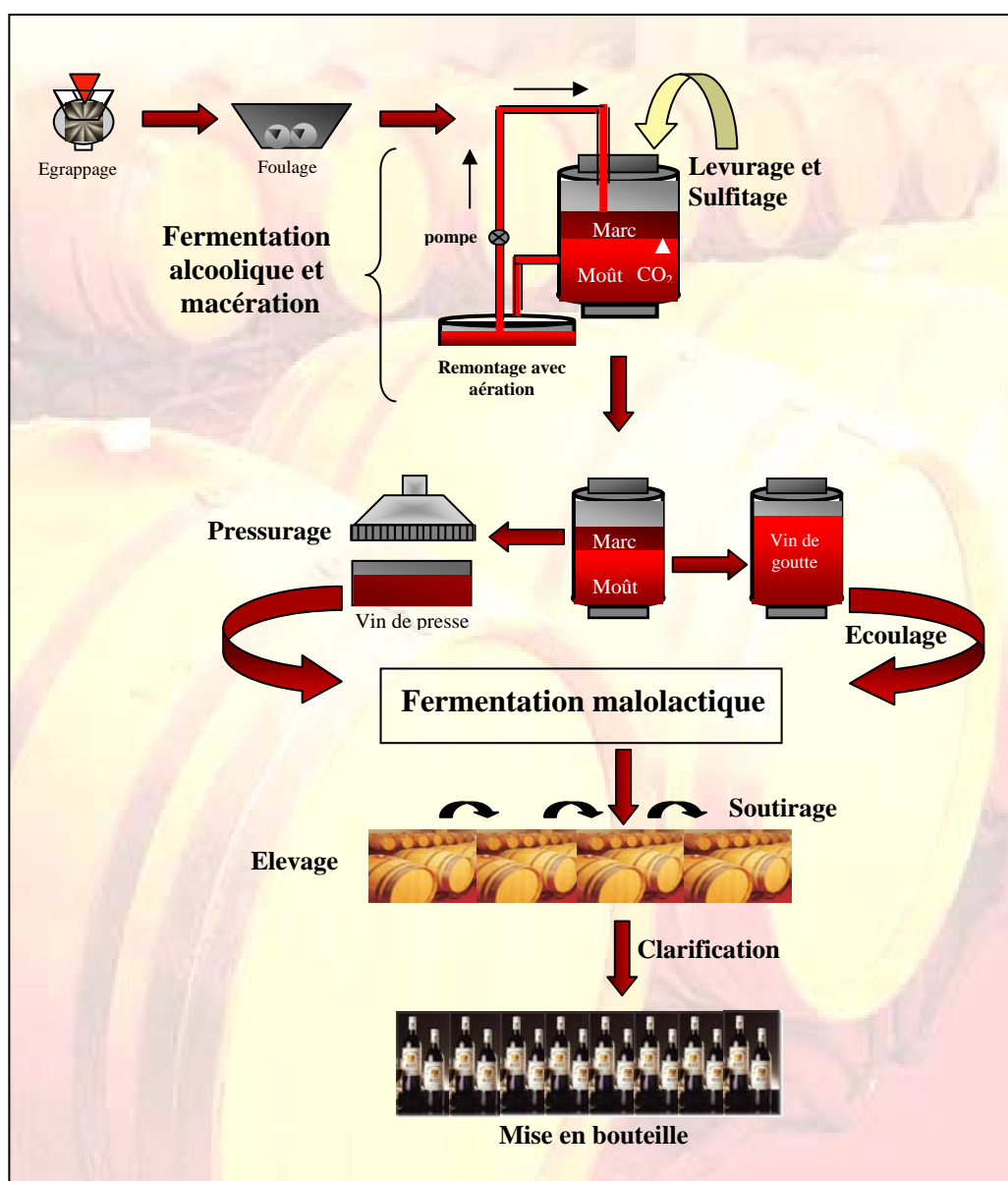


Figure1.1. Procédé d'élaboration du vin rouge.

1.1.2 Principaux paramètres du procédé

Certains paramètres doivent être contrôlés afin d'éviter tout risque d'altération (microbienne, ou organoleptique) ou d'arrêt de la fermentation. Parmi les principaux paramètres à maîtriser pour obtenir un vin de bonne qualité on peut citer, la température de fermentation, le levurage, la fourniture de nutriments (azote, oxygène) et les remontages. La **température de fermentation** est un paramètre très important à contrôler parce qu'elle va influencer sur le déroulement de la fermentation. Une température trop élevée risque de provoquer un arrêt de la fermentation. Par contre, dans le cas de températures très faibles, il y a le risque de non départ en fermentation (faible croissance des levures). Le risque est alors d'avoir une augmentation de l'acidité volatile et une diminution des qualités organoleptiques. Les températures optimales de fermentation pour les vins rouges sont: 28-30°C (et de 18-20°C pour les blancs). Le **remontage** consiste à homogénéiser les moûts afin de favoriser les échanges entre les matières solides et liquides et à les aérer afin de fournir de l'oxygène aux levures et d'éviter la réduction du SO₂ en H₂S. Finalement, le **levurage qui consiste à apporter des levures en pleine activité et en nombre suffisant** a pour objectif de permettre une transformation totale des sucres en alcool et d'éviter le développement d'une flore de contamination.

1.1.3. Biochimie de la production du vin

Au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin, de nombreuses espèces microbiennes se développent successivement. Cependant, *Saccharomyces cerevisiae* est la plus importante espèce levurienne présente dans les différentes surfaces des équipements intervenant dans la production du vin, démontrant ainsi les effets sélectifs du jus de raisin et du vin comme substrat de croissance (Serra 2004).

La fermentation alcoolique en conditions œnologiques s'effectue en quasi-anaérobiose (10 mg d'oxygène disponible/L dans le moût et au début de la fermentation). Donc le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* dans de telles conditions est strictement fermentaire (Salmon et coll., 1994).

En général, le moût de raisins contient entre 140 à 260 g/L de sucre répartis entre glucose et fructose. Ces sucres sont catabolisés suivant la voie d'Embden-Meyerhoff aussi appelée glycolyse. Le produit final de la glycolyse est le pyruvate lequel par décarboxylation donne de l'acétaldéhyde lui même réduit en éthanol grâce au NADH^+ formé au cours de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces deux réactions sont couplées et constituent un mécanisme d'oxydoréduction. La **figure 1.3** montre de façon simplifiée le chemin suivi par le glucose vers les différents produits de la fermentation alcoolique. Selon Gay-Lussac la fermentation alcoolique devrait produire une quantité d'éthanol d'environ 51.1% du glucose catabolisé, mais en raison de la formation des autres composés pendant la fermentation la quantité d'alcool produite correspond à 47-48% du sucre consommé.

La fermentation complète d'un moût conduit à la production de différents composés (**tableau I.1**). Ce milieu est caractérisé par une très forte acidité avec un pH compris entre 3.4 et 4.

Tableau I.1. Composés principaux du vin

Composé	Quantité
Ethanol	8-15% vol.
Glycérol	6-8 g/L
Pyruvate	< 1 g/L
Acide succinique	< 1g/L
Acide acétique	< 1 g/L
Alcools supérieurs et esters	< 0.3 g/L

1.1.4. Contamination microbienne lors de l'élaboration du vin

Au cours de la fermentation des moûts, un grand nombre d'espèces différentes de levures peut être mis en évidence (Heard et Fleet , 1985 ; Schüt et coll., 1993). En fait, la fermentation alcoolique du jus de raisin peut être effectuée spontanément par la flore sauvage naturellement présente sur le raisin. Dans ces conditions, les œnologues ont observé une grande variabilité de la qualité du vin ainsi que des risques accrus de contamination.

Dans ce sens, l'impact des levures de contamination *Brettanomyces* a été prouvé par de nombreux auteurs sur des vins de différents pays et régions de France (Schanderl et Draczinski, 1952), des vins mousseux allemands (Barret et coll., 1955), des vins jaunes d'Arbois (Galzy et Rioux, 1955), ou des vins du Midi de la France présentant la maladie de « la fleur ». En 1956 Domercq dans son étude a rapporté l'isolement de souches de *Brettanomyces* dans des moûts des appellations Saint-Emilion et Premières-Côtes-de-Bordeaux et dans des vins rouges ou blancs en cours de conservation des appellations Médoc, Graves et Saint-Emilion. Des levures *Brettanomyces* ont aussi été isolées de vin en provenance du Brésil (De Toledo et coll. 1959), d'Italie (Di Stefano, 1985 ; Ciolfi, 1991), de la Nouvelle Zélande (Wright et Parle, 1974), du Royaume uni de Grande Bretagne (Tucknott, 1977), d'Australie (Hersztyn 1986), du Portugal (Henschke, 1996). Quant aux cépages, le pinot noir semble être le plus touché ; en Bourgogne par exemple, 50% des vins en fermentation issus de ce cépage et 25% après embouteillage ont été infectés (Gerbaux et coll. 2000).

En 1986, ces levures ont été mises en cause dans l'origine de certaines odeurs désagréables qualifiées de « sueur de cheval » dans des vins californiens et bordelais conservés en barriques neuves (Froudiere et Larue, 1988).

Larue et coll. (1991) confirment que *Dekkera/Brettanomyces* est une levure de contamination présente dans les chais et qui peut contaminer les moûts au cours des opérations pré-fermentaires ou les vins rouges en cours d'élevage (barriques usagées, opérations d'ouillage, d'assemblage ou pendant la mise en bouteilles). Ces genres de levures sont typiquement associés aux vins rouges en cours de vieillissement dans des fûts de bois.

Une étude faite par Fugelsang (1998) a montré que *Brettanomyces* et *Dekkera* sont capables d'effectuer la fermentation alcoolique et qu'elles peuvent s'installer dans le jus de raisin en fermentation même si leur croissance est plus lente que celle de *Saccharomyces cerevisiae* (principale espèce de fabrication du vin). Au départ de la fabrication du vin, ces levures sont trouvées dans des dépôts organiques dans les pompes servant au transfert du moût, et surtout le bois des tonneaux (Blondin et coll., 1984). Certains insectes, comme la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*,

peuvent être le vecteur de la contamination par *Brettanomyces* (Shehata et Mark, 1951 ; Van Der Walt et Van Kerken, 1959).

Ces levures du genre *Brettanomyces* sont considérées comme indésirables puisque dans le jus de fermentation elles produisent d'importantes quantités d'acide acétique, d'acide gras à courtes chaînes (de C8 et C14) et d'esters éthyliques qui vont se fixer sur la paroi ou s'accumuler dans le cytoplasme de *Saccharomyces cerevisiae* entraînant une inhibition de sa croissance et finalement sa mort (Van der Walt., 1984; Larue et coll. 1991; Rasmussen et coll., 1995). Ainsi, *Brettanomyces* provoque un déséquilibre du vin et une altération des produits secondaires, en particulier une augmentation de l'acidité volatile qui peut aller jusqu'à 2.75 g/L (valeur supérieure à la dose autorisée dans le vin) (Chatonnet et coll., 1999 ; Suárez et coll., 2004).

De plus, *Brettanomyces* est capable de produire divers composés susceptibles d'altérer l'arôme et le goût des vins. Parmi eux, les plus abondants sont les phénols volatiles comme le 4-éthyl-guaïacol et surtout, le 4-éthylphénol (Heresztyn, 1986 ; Chatonnet et coll., 1995). D'après Chatonnet et coll., 1997 ces levures du genre *Brettanomyces* sont les seuls micro-organismes capables de former plusieurs milligrammes d'éthylphénols par litre de vin à partir des acides phénoliques, ces composés donnant des odeurs « d'écurie et de sueur de cheval ».

Ribéreau-Gayon (1998) a montré que l'apparition « d'odeur de souris » peut aussi être due à la présence de *Brettanomyces* dans le vin. Ce défaut organoleptique est lié à des substances appelées tétrahydropyridines qui se forment suite à la condensation de la lysine et d'éthanol. Certaines bactéries lactiques sont également parfois impliquées.

La contamination par *Brettanomyces* la plus fréquente intervient sur vin fini, au cours du processus d'élevage, alors que les fermentations alcoolique et malo-lactique sont terminées. *Brettanomyces* peut exploiter les traces de sucres résiduels (300 mg/L) présents dans tous les vins (glucose, fructose, mannose, galactose, tréhalose et saccharose). Le développement de ces levures peut intervenir en anaérobiose, et la fermentation de petites quantités de sucres résiduels est suffisante pour former une quantité d'éthyl-phénols égale à la valeur de leur seuil de perception (425 µg/L) (Chatonnet P. et coll., 1999). Cependant, quelques études récentes ont montré la

présence de ces levures sur les grappes de raisin (Pretorius, 2000; Barbin, 2006; Renouf, 2006)

Les résultats obtenus par Gilis et coll. (2003) ne permettent pas de mettre en évidence un effet stimulant des apports d'oxygène ménages sur la croissance de *Brettanomyces* et la production d'éthyl-phénols et montrent que cette levure est parfaitement capable de se développer dans les vins en absence totale d'oxygène. Par contre, ces auteurs ont affirmé que la présence de sucre résiduel favorise dramatiquement la croissance de *Brettanomyces* et la production de phénols volatils et aboutit à une destruction totale des qualités aromatiques du vin. Ainsi les accidents provoqués par cette levure sont probablement le résultat de fermentations mal maîtrisées et incomplètes. Ces résultats ont été aussi rapportés par Chatonnet (1995).

Enfin, il existe une hypothèse selon laquelle les *Brettanomyces* peuvent rester à l'état viable mais non cultivable (VCN) pendant de longues périodes. Ces cellules en état VCN, qui ne peuvent pas être observées avec les méthodes traditionnelles de culture, poursuivent la métabolisation des nutriments à partir de leur environnement et sont donc toujours considérée comme vivantes. (Millet et coll., 2000).

En définitive, le genre *Brettanomyces* à ce jour est encore source de problèmes dans l'élaboration du vin et plusieurs études sont en cours pour essayer de mieux comprendre son métabolisme et de cette façon établir un contrôle de son activité ou son élimination. A ce jour, les traitements utilisés pour les contrôler sont répertoriés ci-dessous (**tableau I.2**):

Tableau I.2. Traitements utilisés pour le contrôle de *Brettanomyces*

Traitement	Caractéristiques	Inconvénients
Ajoute de SO ₂	Antiseptique et fongistatique. Une concentration d'environ 0.5-0.8 mg/L de SO ₂ moléculaire est recommandée pour inhiber la croissance de <i>Brettanomyces</i> . (Henick-Kling et coll. 2000)	Difficile de maintenir une concentration stable tout au long de la fermentation alcoolique ou pendant l'élevage
Ajoute de protéines (caseine ou caseinate de potassium)	L'ajoute de protéines avant l'élevage diminue de 40 à 2000 fois la population de <i>Brettanomyces</i> (Murat et coll. 2003) et réduit ainsi la quantité des éthyl-phénols (Ruiz-Hernández, 2003).	Réduction des arômes et la couleur du vin.

Filtration	Processus de séparation des particules solides. Utiliser des membranes avec une porosité inférieure à 0.45 µm (Calderón et coll., 2004).	L'emploi de membranes avec une porosité très fine peut détériorer la structure colloïdale du vin et réduire l'intensité de la couleur et des arômes du vin.
Contrôle des paramètres physico-chimiques.	<ul style="list-style-type: none"> • Maintenir un pH bas • Faibles niveaux d'oxygène Température pendant l'élevage ou stockage 13°C <ul style="list-style-type: none"> • Diminution de temps de macération. 	Diminution du corps, de la structure, de la couleur et de l'arôme du vin. Contradictions dans les tendances actuelles dans l'élaboration du vin.
Ajoute de DMDC (dicarbonate de diméthyle)	Est un antiseptique principalement actif contre les levures. Une dose entre 250 et 400 mg/L peut inhiber la croissance des levures. Cependant, il a été prouvé que une souche de <i>Brettanomyces anomalus</i> n'a pas été inhibée (Delfini et coll., 2002).	Son efficacité dépend de caractéristiques génétiques des levures. Non rémanent.
Ajoute de chitosane	C'est un polysaccharide bactériostatique et fongistatique dérivé de la chitine. Son effet est d'augmenter la phase de latence de <i>Brettanomyces</i> . Une concentration entre 3-6 g/L inhibe complètement la croissance de cette levure sans affecter la développement de <i>Saccharomyces</i> (Gómez-Rivas et coll., 2004).	Pas employé dans l'industrie. Etude faite au niveau laboratoire.
Ajoute des acides faibles.	Les acides sorbique, benzoïque, fumarique sont connus comme fongistatiques. Ils peuvent augmenter la phase de latence des micro-organismes indésirables mais ne provoquent pas une inhibition totale.	Seul le sorbate de potassium est autorisé dans l'élaboration du vin.
Application de pression	L'application de pression entre 400 et 500 MPa pendant 5 à 15 minutes à températures entre 5 et 20°C peut réduire les populations des levures (inclus <i>Brettanomyces</i>) (Puig et coll., 2003).	L'emploi de ce traitement peut modifier les caractéristiques physico-chimiques, l'activité enzymatique ou les propriétés sensorielles du vin.
Contrôle biologique	L'utilisation de toxines produites par des micro-organismes tels que <i>Pichia anomala</i> et <i>Kluyveromyces wickerhamii</i> a montré un effet fongistatique contre <i>Dekkera anomala</i> dans l'élaboration du vin pendant 10 jours (Comitini et coll., 2004).	Etude faite au niveau laboratoire.

Comme on peut l'observer, les traitements exposés sont très divers et contradictoires et à ce jour, les *Brettanomyces* peuvent être surveillées, mais ne sont pas réellement sous contrôle.

1.2. Production d'alcool industriel (distilleries)

Au cours du XIX^e siècle la production d'alcool éthylique à partir de betterave a pris une véritable dimension industrielle. Même si depuis un procédé de synthèse (pétrochimie) a été mis au point, l'alcool d'origine agricole (fermentaire) est largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, dans les industries chimiques, pharmaceutiques et parapharmaceutiques (parfumerie). Actuellement, les principaux pays producteurs d'alcool sont le Brésil, les Etats-Unis et la France.

Dans le cas qui nous intéresse de production d'éthanol par voie fermentaire, les principaux facteurs qui interviennent sont :

- ⇒ *La matière première* : ce sont les substrats riches en sucres susceptibles d'être fermentés (saccharose, glucose, fructose ou des composés cellulosiques ou amylacés). Industriellement les plus utilisés sont : les jus de betterave, les mélasses de canne à sucre ou de betterave, les égouts de sucrerie et les jus d'hydrolyse de diverses céréales (blé, maïs, riz et seigle).
- ⇒ *Le micro-organisme* : Plusieurs chercheurs ont montré que il y a un grande variété de souches capables de produire l'éthanol telles que : *Candida*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula* et *Pichia* (Moulin et coll., 1984 ; Van Dijken et Scheffers, 1984 ; Sanchez et coll., 1997). Néanmoins, la levure utilisée classiquement dans tous les procédés de fermentation alcoolique est du genre *Saccharomyces*.
- ⇒ *La fermentation* : à partir de cette opération biochimique l'éthanol va être fabriqué. Cette opération est l'étape plus importante du procédé.
- ⇒ *La distillation* : c'est la dernière (et la plus énergétiquement coûteuse) étape de la fabrication d'alcool qui permet de récupérer l'éthanol provenant de la fermentation.

1.2.1. Procédés de production

Les procédés de production d'alcool industriel ont été largement décrits. Le **(Tableau I.3)** présente les principaux procédés et leur caractéristiques.

Tableau I.3. Procédés de fabrication d'alcool.

Type du procédé	Procédé	Caractéristiques
Procédé en discontinu	Cuve-mère (De Miniac 1988 et 1991)	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation d'un fermenteur aéré appelé « cuve-mère » où la biomasse est produite pendant chaque cycle de fermentation à partir du moût avec une teneur en sucre faible (70 g/L). • Température de fermentation : 33°C. • Concentration finale obtenue : 70 à 80 g/L. • Productivité varie entre 2.8 et 3.2 g/L/h selon le substrat utilisé.
	Reprise de levure (De Miniac 1988 et 1991 ; Délia-Dupy et coll., 1995)	<ul style="list-style-type: none"> • Réutilisation de la biomasse provenant de la fermentation, mais concentré par centrifugation. • Température de fermentation : 33°C. • Productivité est de l'ordre de 2.0 à 4.4 g/L/h
Procédé en continu	Multi-étages (Molle, 1988)	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisé par les Sociétés Speichim et Vogelbush. • Procédé simple en continu • Utilisable pour des substrats dilués ou concentrés
	BIOSTIL (Riba et Goma, 1981 ; De Miniac, 1991)	<ul style="list-style-type: none"> • Procédé avec recyclage et extraction simultanée de l'éthanol sous vide. • Elimination de l'inhibition par l'éthanol • Fermentation de substrats très concentrés en un temps très court. • Diminution des coûts de distillation.

1.2.2. Principaux paramètres du procédé

Il faut que la fermentation alcoolique se déroule dans les meilleures conditions pour obtenir un produit de bonne qualité. Pour cela on doit prendre en compte certains facteurs qui vont influencer sur la croissance de la levure et son maintien en activité jusqu'à la fin de la fermentation. Ces facteurs sont : les constituants du moût (la teneur en sucres, l'acidité du moût, le taux de non-sucre), la nature de la souche de levure et l'aération. Le degré d'alcool atteint va dépendre de la teneur en sucre dans le moût de fermentation. Le moût doit être acide afin d'éviter tout risque de contamination bactérienne. Le taux de non-sucre va fournir les éléments nutritifs minéraux et organiques pour la levure. Enfin, une faible aération va permettre d'assurer la biosynthèse des stérols des membranes cellulaires nécessaires au maintien la viabilité cellulaire. Ainsi, le bilan fermentaire et la productivité sont favorisés par l'oxygène. Les paramètres exposés vont conduire à des variations sur le rendement en alcool, sa cinétique de production et la formation de sous produits

1.2.3. Contamination microbienne dans l'industrie de production d'alcool (distillerie)

Dans la fabrication d'alcool industriel, des problèmes liés à une contamination du milieu par des micro-organismes « sauvages » (Maiorella et coll., 1984 ; Essia Ngnag et coll., 1989 ; Délia-Dupuy et coll., 1993 ; Almeida Tavares et coll., 1995) sont assez fréquemment observés. Le milieu fermentaire est envahi par le microorganisme contaminant au détriment de la souche mise en œuvre (*Saccharomyces cerevisiae*). Dans le cas des contaminations par des bactéries lactiques dans la plupart des cas, le problème est à ce jour bien maîtrisé avec le contrôle de l'acidité et l'emploi d'antibiotiques comme la pénicilline. En revanche, les contaminations par des levures posent un problème plus complexe.

Le premier cas de contamination par *Brettanomyces* a été décrit par De Miniac en 1989 sur un site fonctionnant selon le procédé BIOSIL. Depuis, le nombre de cas recensés n'a cessé d'augmenter. Les pertes économiques sont très importantes et les causes de ces contaminations demeurent encore mal expliquées. A l'heure actuelle le problème ne peut être résolu que par la vidange complète de la cuverie, suivie d'une remise en route après désinfection des circuits.

En étudiant (dès 1989) ce premier cas de contamination par la levure *Brettanomyces* de Miniac a proposé le schéma suivant (**figure 1.2**): pendant les premiers jours de la fermentation, tout se déroule normalement, la concentration en levures *Saccharomyces* est de 60×10^6 cellules/ml en régime permanent. A partir du 7^{ème} jour de la fermentation les premières cellules de *Brettanomyces* apparaissent et se développent très rapidement. On observe alors une chute rapide de la population des *Saccharomyces* avec comme conséquence une baisse importante de la productivité (d'environ 20%). Cette contamination est aussi accompagnée par une forte augmentation de l'acidité du milieu de fermentation (jusqu'à 7 g/L équivalent en acide sulfurique). Dans ces mêmes travaux De Miniac a montré que la croissance de ces levures était stimulée par l'oxygène (Effet Custer) et par un pH élevé.

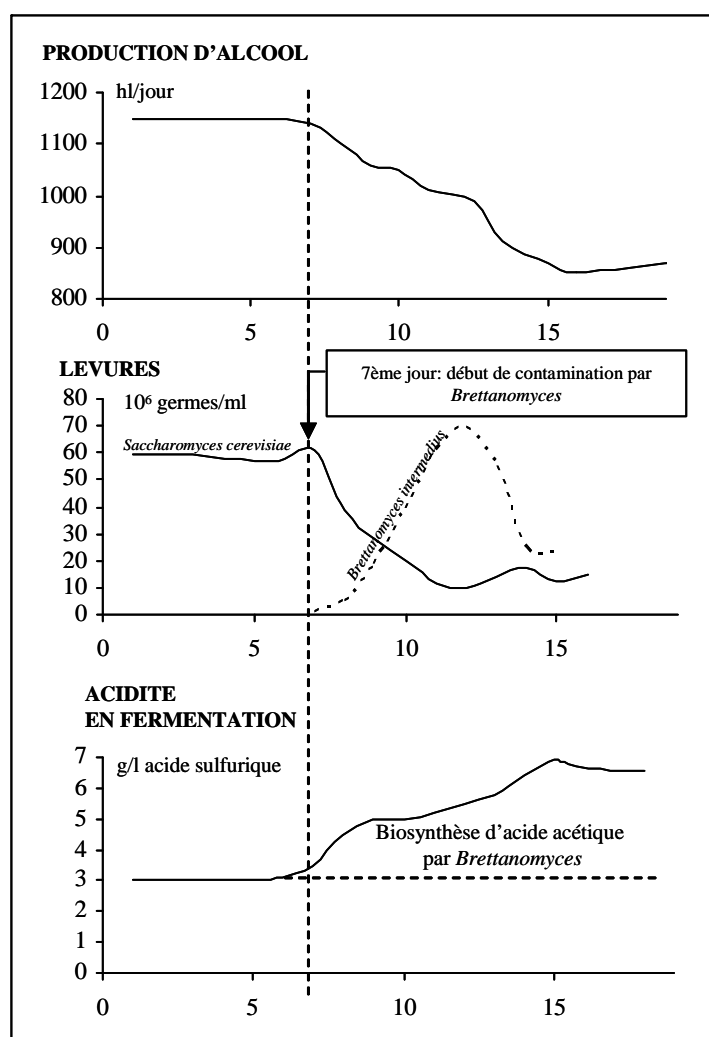


Figure 1.2. Contamination d'une unité de fermentation alcoolique par *Brettanomyces* (De Miniac, 1989).

Par la suite il a été montré que les (six) sites industriels sur lesquels les auteurs ont trouvé la présence de *Brettanomyces* n'avaient entre eux aucun point commun que ce soit leur position géographique, la matière première mise en fermentation, le milieu utilisé, ou le procédé de fermentation alcoolique (Délia-Dupuy et coll., 1995). Il apparaissait que les contaminations par *Brettanomyces* étaient une conséquence d'erreurs de conduite de l'atelier. Une étude ultérieure (Gilis 1999) montrait que deux facteurs exerçaient un rôle majeur: aération et acidité. Dans des conditions d'excès d'air et de manque d'acidité, *Brettanomyces* s'implante dans le milieu de fermentation en formant à la surface des cuves un mousse compacte de couleur marron clair et d'aspect crémeux.

1.3. Le genre *Brettanomyces*

Les travaux réalisés sur le genre *Brettanomyces* peuvent être classées en trois catégories :

- (1) études sur le rôle de ces levures comme contaminants en vinification ou en élaboration d'alcool industriel,
- (2) études portant en vinification sur les défauts analytiques et sensoriels imputables à ces micro-organismes,
- (3) études sur les aspects métaboliques et cinétiques de la croissance

A ce jour, les recherches ont principalement porté sur les points (1) et (2). Par contre, il y a peu de données bibliographiques sur les aspects cinétiques et métaboliques.

1.3.1. Taxonomie et morphologie de *Brettanomyces*

Les levures du genre *Brettanomyces* sont connues depuis 1904 comme impliquées dans la deuxième fermentation des bières (Peynaud et Domercq, 1956) et ont été depuis mises en évidence dans la majorité des boissons fermentaires comme la bière, le vin ou le cidre (Chatonnet P. et coll., 1995 ; Heresztyn T., 1986 ; Larue F. et coll., 1991) et dans les unités de production d'alcool industriel (De Miniac M., 1989 ; Délia-Dupuy et coll., 1997).

Le genre *Brettanomyces* est considéré comme la forme imparfaite du genre *Dekkera* appartenant aux ascomycètes. Les espèces de *Brettanomyces* les plus connues sont: *bruxellensis*, *intermedius*, *anomalus*, *abstinens*, *clausenii*.

La morphologie de ces levures *Brettanomyces* peut changer en fonction des conditions du milieu de culture (Aguilar-Uscanga et coll., 2000). Elles peuvent être sphéroïdes, ogivales, cylindriques, allongées. Bien que plus petites que *Saccharomyces* elles sont facilement visibles au microscope optique et elles apparaissent isolées, en paire ou formant des petites chaînes et des pseudomycelium. Ces cellules se multiplient par bourgeonnement multipolaire (Van der Walt, 1970 ; Shung-Chang et coll., 1985). En reproduction sexuée (*Dekkera*), elles forment des asques contenant 1 à 4 ascospores. Leur croissance est lente et elles donnent d'importantes quantités d'acide acétique à partir des sucres.

En conditions de stress ces levures *Brettanomyces*, deviennent très petites et peuvent traverser les membranes au seuil de coupure de 0.45µm. Sous cette forme, elles sont considérées comme viables mais non cultivables (VNC) c'est-à-dire capables de reprendre une croissance normale après une culture d'enrichissement (Millet et Lonvaud, 2000).

1.3.2. Aspects physiologiques et métaboliques

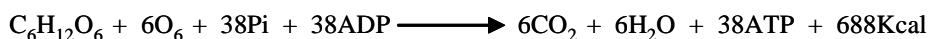
Les levures du genre *Brettanomyces* ont un métabolisme de type fermentatif ou oxydatif (**figure 1.3**) selon l'espèce considérée et les conditions de culture.

La première étape de transformation du glucose suit la voie d'Embden Meyerhof Parnas (EMP) aussi appelée glycolyse. Cette étape qui se déroule dans le cytosol est commune pour la respiration et la fermentation. Elle comprend une série de dix réactions, chacune catalysée par une enzyme spécifique. La glycolyse conduit à la formation de 2 molécules de pyruvate à partir duquel les voies de respiration ou de fermentation seront activées.

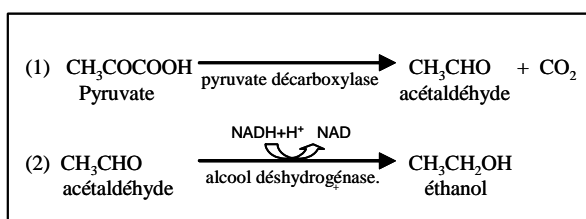
A) Métabolisme respiratoire : la respiration est activée seulement en aérobiose (présence d'oxygène). Cette voie a trois fonctions principales: (1) la production d'ATP; (2) la régénération du cofacteur NAD⁺ et (3) la formation de radicaux carbonés intermédiaires pour les biosynthèses cellulaires. La respiration est obtenue

en trois étapes : le pyruvate est transformé en acétyl-CoA par le pyruvate déshydrogénase, puis l'acétyl-CoA formée rentre dans le cycle de Krebs (qui se déroule dans la mitochondrie), et finalement la chaîne respiratoire est active.

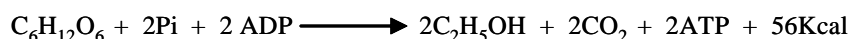
Le bilan aérobie théorique est :



B) Métabolisme fermentaire : Cette voie métabolique se déroule classiquement en anaérobiose. L'acide pyruvique produit à la fin de la glycolyse est décarboxylé en acétaldéhyde lui même réduit en éthanol grâce au NADH^+ formé au cours de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces deux réactions sont couplées et constituent un mécanisme d'oxydoréduction.



Le bilan anaérobie théorique est :



Cette voie en comparaison avec la voie respiratoire montre un très faible gain énergétique (2 ATP/par glucose) puisque le gain est seulement lié à la seule phosphorylation au niveau du substrat (glycolyse) et que la chaîne respiratoire qui donne 36 ATP n'est pas active.

Le rendement théorique en éthanol est de 0.51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Cependant les réactions de maintenance, de synthèse des infrastructures cellulaires et la formation des composés secondaires (acide acétique, substance de réserve) limitent ce rendement à 80-90% de sa valeur théorique. Dans ces conditions, le rendement en biomasse est de l'ordre de 0.10 g/g de glucose (Kappeli, 1986).

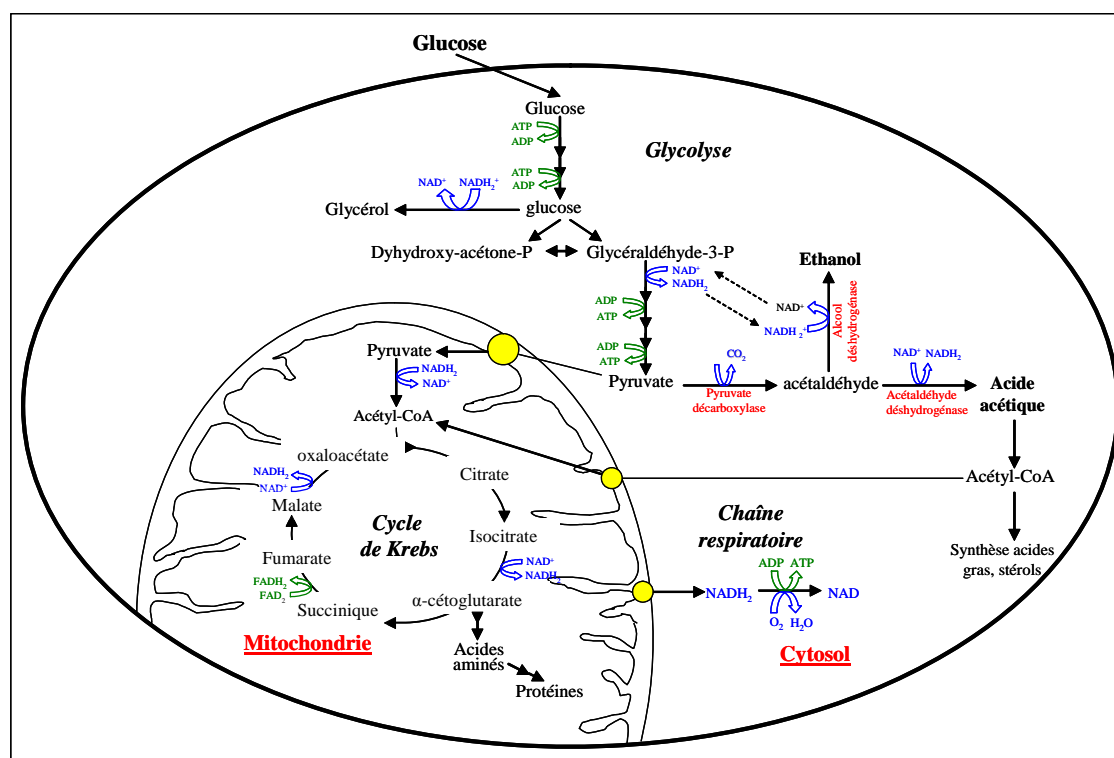


Figure 1.3. Schéma récapitulatif des voies métaboliques (respiration et fermentation) et des voies métaboliques annexes pouvant conduire à la production de sous-produits.

Les *Brettanomyces* sont des levures de fermentation très lente, mais bonnes productrices d'alcool puisqu'elles peuvent atteindre 13% (v/v) dans des fermentations aérées (Peynaud et Domercq, 1956).

1.3.3. Besoins nutritionnels

Les levures nécessitent différents substrats pour leur développement. Ces substrats selon leur concentration dans le milieu de culture et leur nature vont avoir un effet activateur ou inhibiteur sur la croissance

Nous allons nous intéresser aux caractéristiques du genre *Brettanomyces* en nous référant à celles de *Saccharomyces cerevisiae*, levure plus utilisée et mieux connue.

- **Assimilation de sources de carbone**

Les composés carbonés représentent la source de carbone et d'énergie pour les micro-organismes. Les fermentations alcooliques se font sur des milieux riches en sucres. Les levures du genre *Brettanomyces* peuvent fermenter le glucose, le saccharose, le maltose,

le tréhalose, le cellobiose, le lactose(Van der Walt, 1970 ; Smith et Van Grinsven, 1984). Par contre, *Saccharomyces* n'a pas la capacité à fermenter le lactose, le melibiose, la cellobiose, ni les sucres à 5 atomes de carbone comme la xylose ou l'arabinose (Jones et coll., 1981). Ces deux genres de levures peuvent assimiler l'éthanol, l'acide lactique, l'acide succinique, entre autres.

En ce qui concerne les mécanismes d'assimilation des sucres, il existe peu de travaux disponibles pour le genre *Brettanomyces* et ils sont parfois contradictoires. Par exemple, selon Gaunt et coll. (1988), chez *Brettanomyces anomalus* le glucose pénètre par transport actif alors que pour Gancedo et Serrano (1989) le transport du glucose se fait par diffusion facilitée comme chez *Saccharomyces*. Plus tard Géros et coll. (1997) mettent en évidence deux types de transporteurs du glucose chez *Dekkera anomala*: un transporteur de faible affinité qui accepte aussi le fructose et un transporteur à haute affinité qui accepte le galactose, mais pas le fructose.

Parmi les sucres utilisables par *Brettanomyces*, la cellobiose a un important intérêt industriel. Le but est d'utiliser ces levures pour la valorisation des substrats cellulotiques dans le procédé de saccharification et fermentation simultanées (SSF). La β -glucosidase est la clé de l'hydrolyse de la cellobiose (Blondin et coll., 1982 ; Parekh et coll., 1988). A ce sujet, *Brettanomyces clausenii* et *custersii* semblent être les plus performants.

Les levures *Brettanomyces* peuvent croître sur l'éthanol comme unique source de carbone, mais il faut d'abord transformer l'éthanol en acétate (Rodriguez et coll., 2001). Ces levures peuvent aussi utiliser l'acide acétique comme seule source carbonée jusqu'à 3% v/v pour des valeurs de pH entre 3 à 6 (Géros et coll., 2000).

- **Assimilation des sources d'azote**

L'azote représente environ 10% du poids sec de la cellule. Il joue un rôle capital car il entre dans la constitution de molécules simples (acides aminés, nucléotides, vitamines et coenzymes) essentielles au fonctionnement cellulaire. Les études menées par Ribéreau-Gayon et coll. (1975) sur *Saccharomyces ellipsoideus* ont montré que plus les levures sont riches en azote, plus forte est leur activité fermentaire et au contraire plus faible est

leur activité respiratoire. L'azote peut être utilisé par les levures sous plusieurs formes (inorganique ou organique). Les levures comme *Brettanomyces bruxellensis* et *intermedius* ont la capacité d'utiliser les nitrates contrairement aux genres *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*... pour lesquels la seule source d'azote inorganique assimilée est l'ion ammonium, (Jones et coll., 1981 ; Larpent, 1991). L'espèce *Brettanomyces anomalus* possède donc les enzymes nitrate réductase et nitrite réductase. Cependant, ces enzymes sont inhibées par un excès d'ammonium, ce qui favorise l'utilisation de sources d'azote organique plutôt que minéral. Smith (1984) a montré que du fait de cette régulation, elles ne forment pas des nitrosamines dans les bières. En règle générale, le sulfate d'ammonium et le phosphate di-ammonique sont les sels les plus utilisés comme source d'azote, puisqu'ils apportent en même temps le soufre et le phosphore nécessaire à la cellule (Brock, 1970). Enfin, l'utilisation et l'assimilation de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé varie selon la levure utilisée et est affectée par de nombreux facteurs à savoir, l'aération, la concentration de substrat carboné, ainsi que par la propre concentration de la source azotée. Les études réalisées par Aguilar-Uscanga et coll. (2000) sur les besoins nutritionnels de *Brettanomyces bruxellensis* ont mis en évidence que le sulfate d'ammonium a une influence significative sur la consommation de glucose, la croissance et la production d'éthanol. Dans leurs conditions expérimentales, ces auteurs ont observé un effet inhibiteur sur la croissance de cette levure lorsque la concentration en sulfate d'ammonium excède 2g/L.

- **Assimilation du phosphore**

Ce composé est nécessaire pour la croissance de la levure et pour la fermentation. Il est assimilable par la levure sous forme de phosphate par un mécanisme de transport actif (Jones et coll., 1981). Le rôle du phosphore est de maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire et il participe aussi dans la synthèse de lipides et carbohydrates. L'ion phosphate n'apparaît pas généralement comme limitant pour le développement de *B. bruxellensis*. Il semble que cet ion soit apporté en quantité suffisante dans les milieux de fermentation « naturels » ou par l'extrait de levure dans les milieux synthétiques. Ainsi, *B. bruxellensis* peut être considérée comme une levure peu exigeante sur le plan nutritionnel (Gaunt et coll., 1988 ; Aguilar-Uscanga et coll., 2000).

- **Utilisation des oligo-éléments, vitamines et facteurs de croissance**

Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de divers enzymes impliquées dans le métabolisme microbien. Ils sont nécessaires en très petites quantités mais un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (Blackwell et coll., 1995). Par rapport aux facteurs de croissance, les levures du genre *Brettanomyces* sont considérées comme auxo-autotrophes, puisqu'il a été montré qu'elles peuvent toujours avoir une croissance en l'absence complète de vitamine. Cependant la présence de ces vitamines est positive : par exemple, en milieu carencé en thiamine, la population levurienne finale est très faible (10% de la population normale) et la transformation des sucres est extrêmement lente. De même en ce qui concerne la biotine, Peynaud et Domercq (1956) ont montré que son absence retarde beaucoup plus la fermentation de sucre que la croissance, contrairement à ce qui passe chez *Saccharomyces*.

1.4. Mécanismes de répression catabolique

L'activation des voies métaboliques de la levure dépend des mécanismes génétiques de la cellule et des facteurs physico-chimiques tels que : le pH, la température, l'oxygène, la présence de composés inhibiteurs et la concentration en substrats. Dans ce sens, la concentration en glucose et l'aération dans le milieu de fermentation jouent un rôle important. Ainsi, divers mécanismes de régulation ont été décrits chez les levures (*Saccharomyces*, *Brettanomyces*) tels que: l'effet Pasteur, l'effet Crabtree et l'effet Custer.

1.4.1. Effet Pasteur

La croissance de levures en aérobiose et anaérobiose a été comparée pour la première fois par Pasteur. Il a constaté une inhibition de la fermentation par la respiration. C'est-à-dire, pour de faibles concentrations en sucre, l'aération induit une augmentation de la quantité de biomasse formée, une diminution de la production d'alcool et de la consommation de sucre: c'est l'effet Pasteur (Lagunas, 1986 ; Ribéreau-Gayon et coll., 1998).

Pour essayer d'expliquer ce comportement métabolique une hypothèse a été émise: « *l'inhibition de la fermentation par la respiration peut s'expliquer par la compétition des enzymes catalysant soit la respiration ou la fermentation du pyruvate* ». En fait, quand deux enzymes sont en compétition pour un même substrat, la constante d'affinité (qui est inversement proportionnelle à la vitesse d'une réaction enzymatique) est un paramètre décisif pour l'orientation du flux métabolique vers l'une ou l'autre des voies. Un exemple de ce mécanisme se situe au niveau des enzymes situées au carrefour entre le métabolisme oxydatif et fermentaire. La pyruvate décarboxylase responsable de la dégradation du pyruvate en acétaldéhyde possède en effet une plus faible affinité pour celui-ci que le complexe mitochondrial de la pyruvate déshydrogénase responsable de son oxydation (Gancedo et Serrano, 1989). Un autre exemple est au niveau de l'acétaldéhyde (**figure 1.3**). La constante d'affinité de l'acétaldéhyde déshydrogénase (6 μ M) est 100 fois plus faible que celle de l'alcool déshydrogénase (0.61mM), l'acétaldéhyde, une fois formé par le pyruvate, est majoritairement oxydé en acétate (acide acétique). Le métabolisme de la levure est alors respiratoire et la formation de biomasse devient optimale (Postma et coll., 1989).

Cet effet de répression catabolique est présent chez les levures du genre *Saccharomyces*. Par contre, chez *Brettanomyces* cet effet de répression n'est pas présent.

1.4.2. Effet Crabtree

En 1929 Crabtree découvrit que lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu aéré et avec un excès de glucose la fermentation alcoolique est favorisée. Petrick en 1983 explique que ce phénomène est dû à une déficience de la capacité respiratoire chez ces cellules, qui se trouvent obligées d'accumuler le pyruvate pour une dégradation ultérieure par les voies fermentaires. Une levure sera considérée comme « Crabtree positive » si on observe pour des fortes concentrations de glucose une répression de son métabolisme oxydatif et donc une formation d'éthanol. En revanche, les levures qui sont susceptibles de fonctionner en métabolisme oxydatif (respiration) même à de très fortes teneurs en sucre sont dites « Crabtree négatives ». Les levures du genre *Saccharomyces* et *Brettanomyces* sont considérées comme Crabtree positives (van Dijken et Scheffers, 1986 ; Scheffers, 1992 ; Gilis, 1999).

1.4.3. Effet Custer

Ce phénomène se rencontre chez certaines levures, en particulier du genre *Brettanomyces*. Elles fermentent le glucose plus rapidement en présence d'oxygène qu'en anaérobiose. L'effet Custer est le résultat de la formation excessive de NADH, due à la formation de l'acide acétique qui provoque un déséquilibre redox (NAD^+/NADH) et de l'incapacité à produire du glycérol (Scheffers, 1992). Ce phénomène a été justifié de la façon suivante : en présence d'oxygène la cellule pourrait plus facilement réoxyder ses coenzymes réduits dans la chaîne respiratoire, lui permettant d'augmenter le flux glycolytique (Gancedo et Serrano 1989). En revanche, *Saccharomyces* n'est pas sensible à l'effet Custer et montre une activation de la fermentation en absence d'oxygène (Effet Pasteur) (Gilis, 1999).

1.5. Influence des paramètres environnementaux sur la croissance

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques (température, pH, oxygène, etc...). Donc la connaissance de ces facteurs environnementaux pour une levure donnée va permettre de connaître sa distribution écologique et de contrôler son développement.

1.5.1. Effet de la température

La température est un facteur qui affecte profondément les micro-organismes, comme tous les êtres vivants. En effet, les micro-organismes sont particulièrement sensibles à la température parce qu'ils sont unicellulaires et que leur température varie avec celle du milieu extérieur. Il est donc important de connaître les effets de la température sur la croissance du microorganisme et la thermosensibilité des réactions catalysées par les enzymes. Aux faibles températures, l'activité cellulaire microbienne peut être totalement bloquée. Par contre, une élévation de la température va augmenter la vitesse de croissance. En effet, on considère généralement qu'à chaque augmentation de 10°C la vitesse de réaction catalysée par une enzyme sera doublée. Alors, le métabolisme cellulaire sera plus actif aux températures plus élevées et le micro-organisme se développera plus vite. Cependant, au-delà d'un certain point, de nouvelles augmentations diminuent la croissance et des températures trop élevées sont létales,

puisqu'elles endommagent les micro-organismes en dénaturant les enzymes, les systèmes de transport et d'autres protéines. Les membranes microbiennes sont aussi détruites par la chaleur. Ainsi, même si certaines enzymes fonctionnelles sont activées à ces températures élevées, le micro-organisme peut être tellement endommagé que sa croissance est inhibée, et ce de façon irréversible (Prescott et coll., 1995). Dans le cas de faibles températures les membranes perdent leur fluidité et les enzymes travaillent moins rapidement. Enfin, la température optimale d'activité est toujours plus proche de la température maximale que de la température minimale.

Les micro-organismes peuvent se classer selon l'échelle de température caractéristique de leur croissance (**Tableau I.4**).

Tableau I.4. Classification des micro-organismes par la température (Prescott et coll., 1995).

Classification	Caractéristiques
Psychrophiles	Micro-organismes adaptés et capables de survivre à des températures froides. Ces micro-organismes présentent un optimum de température de 15°C, mais peuvent se développer entre 0°C (température minimale) et 20°C (maximale). Les systèmes de transport et les mécanismes de synthèse protéique fonctionnent bien à basse température. Leurs membranes cellulaires possèdent des niveaux élevés d'acides gras insaturés et restent semi-fluides dans le froid. La croissance des micro-organismes psychrophiles est lente en comparaison avec celle des autres groupes.
Mésophiles	La plupart des micro-organismes font partie de cette catégorie. Les températures optimales des mésophiles sont entre 20 et 45°C et leur température minimale se situe entre 15 et 20°C. L'habitat de ces organismes est très diversifié et cosmopolite : le sol, l'eau douce et l'eau de mer, les eaux usées, les végétaux, les animaux et l'homme
Thermophiles	Micro-organismes qui peuvent se développer à des températures de 55°C (optimum) ou plus. Les thermophiles ont des enzymes beaucoup plus stables à la chaleur et des systèmes de synthèse protéique capables de fonctionner à de hautes températures et leurs lipides membranaires sont plus saturés que ceux des micro-organismes mésophiles.

La température a également une influence sur les voies métaboliques de la levure, et ainsi une modification de la température de fermentation entraîne des différences dans

la formation de métabolites secondaires tels que le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique, etc., (Fleet et Heard, 1993; Lafon-Lafourcade, 1983).

L'étude faite par Torija et coll. (2002) sur l'effet de la température chez *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation alcoolique a montré un allongement de la phase de latence à basse température (15°C). Cependant, la population est restée viable tout au long de la fermentation. Par contre, à une température élevée (35°C) la fermentation a été plus rapide mais avec une diminution de la viabilité cellulaire dès le début de la fermentation. Par rapport au métabolisme, ces auteurs ont observé à température élevée une augmentation des produits secondaires de la fermentation, tandis qu'aux températures plus faibles la production d'éthanol a été favorisée.

Enfin, il a été observé une diminution de la vitesse de croissance et de la productivité du procédé quand la température est supérieure à la température optimale de croissance. Ce comportement est dû à la dénaturation des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire (Converti et coll., 1996). En général, la température optimale de culture des levures se situe entre 25 et 30°C.

1.5.2. Effet du pH

Le pH est un autre facteur important de la croissance des levures, car il va déterminer l'activité métabolique des cellules. La valeur du pH a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire (Martinez et coll., 1999 ; Sanchez et coll., 1997).

Les pH alcalins sont, d'une façon générale, préjudiciables aux micro-organismes, la limite de leur développement se situant pour des valeurs d'ordre de 9 à 9.5. On observe pour les valeurs de pH entre 0 et 8 différents types de comportement liés à l'aptitude des microorganismes à tolérer et/ou métaboliser les acides organiques (ou minéraux) présents dans le milieu. Ainsi, les bactéries, en règle générale, sont neutrophiles, présentant une meilleure croissance pour les pH voisins de 7 et sont partiellement inhibées à une valeur de pH inférieure à 5.

Au contraire, les levures et les moisissures présentent une bonne aptitude à métaboliser les acides organiques et peuvent se développer très bien dans une ample zone de valeurs de pH comprises entre 2.5 et 8.5.

Contrairement à la température, le pH interne n'est pas nécessairement égal à celui du milieu de culture et sa valeur est proche de la neutralité dans la majorité des micro-organismes. Cette différence entre le pH interne et externe peut résulter de l'imperméabilité de la membrane plasmique aux protons. La concentration en ions hydrogène intracellulaire et extracellulaire n'est pas équilibrée et un gradient de concentration d'ions peut être créé à travers la membrane. Ce gradient de concentration, associé au potentiel électrique de la membrane, détermine la force motrice des protons qui contrôle les réactions membranaires.

Le pH interne a une influence importante sur l'activité des cellules et des systèmes intracellulaires tels que la synthèse des protéines, les mécanismes de transport, l'activité enzymatique et l'excrétion des métabolites pendant la fermentation (Liu S. et coll. 2003). Le pH externe, peut influencer sur la vitesse avec laquelle les molécules sont transportées vers l'intérieur de la cellule et des valeurs de pH extrêmes peuvent endommager la membrane cellulaire et provoquer la mort cellulaire (Eddy, 1982).

Le pH joue aussi indirectement en agissant sur les équilibres de dissociation de divers constituants du milieu (acides organiques) ou d'adjuvants du procédé de vinification comme l'anhydride sulfureux.

1.5.3. Rôle de l'oxygène

L'oxygène est une molécule nécessaire pour la biosynthèse de molécules indispensables pour la cellule tout particulièrement celle des acides gras insaturés et des stérols qui protègent les levures du stress alcoolique (Scheffers, 1992). En fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae*, une faible aération est donc indispensable pour assurer la survie des levures et l'épuisement complet des sucres en présence de concentrations élevées en éthanol. De plus dans ces conditions, la vitesse spécifique de production d'éthanol est améliorée (Sablayrolles, 1992).

L'oxygène est un substrat particulier puisque il est impossible de le dissoudre à l'avance comme d'autres substrats. Son apport doit donc être continu tout au long de la culture. Cependant, lorsque la concentration levurienne dans le milieu devient importante, le transfert de l'oxygène dans le milieu devient limitant, les besoins de la biomasse étant supérieurs aux flux transférés. La concentration d'oxygène dissous dans le milieu de culture a été identifiée comme l'un des principaux facteurs contrôlant la capacité des levures à se développer en métabolisme oxydatif (Oura, 1974).

Par rapport à la présence d'oxygène les levures peuvent être classées en: aérobies strictes (croissance en présence d'oxygène) et aérobies facultatives. Il n'existe pas de levures anaérobies strictes.

- **Effet de l'oxygène sur *Brettanomyces***

L'oxygène est stimulateur de la croissance et de la fermentation alcoolique chez *Brettanomyces* comme chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, dans des conditions d'aérobiose, les cellules peuvent croître 4 fois plus qu'en anaérobiose (Gilis, 1999).

Chez *Brettanomyces*, en conditions non aérées, la consommation du glucose ne se fait qu'après une longue période de latence. De plus, les vitesses sont très lentes et le rendement en éthanol est moindre qu'en aérobiose (Aguilar-Uscanga, 1998 ; Ciani et coll., 2003) et la production d'acide acétique est très faible ou nulle (Blondin et coll., 1982).

Wijsman et coll. (1984) ont étudié l'effet de l'oxygène chez *Brettanomyces intermedius*. Ils ont observé trois phases dans une culture aérobie:

- 1) pendant la première phase *Brettanomyces* se développe en consommant le glucose et va produire en quantités égales de l'éthanol et de l'acide acétique.
- 2) dans la deuxième phase, la levure va convertir l'éthanol en acide acétique sans croissance.
- 3) enfin, *Brettanomyces* consomme l'acide acétique et une nouvelle croissance est observée.

Plusieurs auteurs ont observé que la fermentation alcoolique chez *Brettanomyces* est stimulée par l'oxygène (Custer M., 1940, Scheffers WA et coll., 1974). Cet effet étant en contradiction avec celui obtenu par Pasteur chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce phénomène fût d'abord nommé « effet Pasteur négatif », pour être ensuite appelé « effet Custer » défini comme : *l'inhibition de la fermentation alcoolique lors du passage en anaérobiose* (Wiken et coll., 1961).

Ce n'est que quelques années plus tard que ce phénomène est expliqué par Carrascosa et coll. (1981). Ils ont observé que le passage de l'aérobiose vers l'anaérobiose conduit à un arrêt brutal de l'activité fermentaire et de la croissance chez *Brettanomyces*. Ce phénomène est expliqué par une perturbation de la balance oxydo-réductrice avec la tendance de ces levures à produire de l'acide acétique. En effet, la synthèse de cet acide nécessite le co-facteur NAD^+ , qui est aussi indispensable au fonctionnement de la glycolyse (Scheffers et Nanninga, 1977). Or le nicotinamide réduit ne peut être oxydé que par les voies de la fermentation alcoolique et celles de la respiration, puisque la synthèse de glycérol chez *Brettanomyces* est insuffisante (ou absente) pour la régénération du cofacteur NAD^+ (Van Dijken et Scheffers, 1986) tandis que chez *Saccharomyces*, la production de glycérol est un chemin de secours pour reconstituer le NAD^+ . Ainsi, lors du passage de l'aérobiose à l'anaérobiose, il y a une accumulation du NADH_2 ce qui entraîne un blocage de la glycolyse au niveau du complexe glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, enzyme NAD-dépendante (Scheffers et Nanninga, 1997). Cependant, ce blocage est transitoire, car, après une phase de latence, la fermentation reprend, mais avec une vitesse beaucoup plus faible qu'en aérobiose.

Selon Gilis (1999) l'inhibition observée en anaérobiose peut être éliminée par l'apport d'oxygène ou par l'ajout de composés accepteurs d'hydrogène dans le milieu de culture, comme l'acétoïne, le diacétyl, l'acétaldéhyde, etc. (Scheffers 1979). Ces accepteurs organiques d'hydrogène ont un effet régulateur sur la balance redox intracellulaire en absence d'oxygène (Gaunt et coll., 1988).

Des travaux plus récents sur l'effet de l'oxygène montrent que la production d'acide acétique par *Brettanomyces* est favorisée par l'augmentation de l'apport d'oxygène (Aguilar-Uscanga et coll., 2003).

1.6. Effet des produits de fermentation et du dioxyde de soufre

En fermentation alcoolique l'effet des produits de la fermentation est très variable et dépend des conditions du milieu de culture et des conditions environnementales. Dans cette partie, nous nous limiterons aux effets liés à l'éthanol, à l'acide acétique et au dioxyde de soufre.

1.6.1. Effet de l'éthanol

L'éthanol est le produit principal de la fermentation alcoolique. Son action est très négative sur le développement des levures, sur la viabilité cellulaire, sur sa propre synthèse (Strehaiano, 1984 ; Charpentier, 1993). L'inhibition de la **croissance** par l'éthanol commence autour de 20 à 40 g/L (Casey et Ingledew, 1986). Chez *Saccharomyces* la concentration inhibitrice (vitesse de croissance = 0) est de l'ordre de 70 à 110 g/L (Casey et Ingledew, 1986) selon l'espèce et la variété. Pour la **production de l'éthanol**, la concentration inhibitrice peut aller jusqu'à plus de 20% (v/v) pour *Saccharomyces cerevisiae* variété *sake* (Hayashida et Ohta, 1981). Enfin, l'effet de l'éthanol sur la **viabilité cellulaire** est moins marqué que sur la croissance elle-même (Casey et Ingledew 1986). L'éthanol peut aussi conduire à l'inhibition de la fermentation (Moulin G. et coll., 1984).

Les facteurs qui ont une influence sur la sensibilité de la levure à l'éthanol sont la température, l'aération et la composition du milieu de culture. Ainsi, plus la **température** de fermentation est élevée (30-40°C), plus la croissance, la viabilité et la production d'éthanol sont sensibles à l'éthanol (Aldigui et coll., 2004 ; Casey et Ingledew, 1986). L'augmentation de **l'aération** en condition de production d'éthanol améliorerait les vitesses de production d'éthanol et diminuerait son effet inhibiteur sur la croissance. L'effet inhibiteur de l'éthanol ajouté sur le taux de croissance et la vitesse spécifique de production dépend aussi des conditions d'aération. Pour ces deux paramètres, l'effet inhibiteur de l'éthanol diminue en condition aérobie par rapport à l'anaérobiose (Aguilera et Benitez, 1985). La **composition du milieu** doit contenir des lipides et vitamines qui vont avoir un impact sur la tolérance à l'éthanol (Alfenore et coll., 2002).

A ce jour les mécanismes d'inhibition de l'éthanol ne sont pas bien élucidés bien qu'ayant fait l'objet de nombreux travaux. Les premières études ont été faites par Nagodawithana et Steinkraus (1976). Ils ont démontré que l'éthanol produit par la fermentation était plus toxique que s'il est ajouté au milieu de culture. Par la suite, il a été montré que l'éthanol avait un effet inhibiteur sur les enzymes impliquées dans la glycolyse, spécialement sur l'hexokinase (Nagodawithana et coll., 1977 ; Navarro, 1980, Novak et coll., 1981). On pense alors que l'accumulation de l'éthanol à l'intérieur de la cellule serait due à un problème de gradient de diffusion de l'intérieur vers l'extérieur. Mais cette théorie est contradictoire avec les résultats obtenus par Millar et coll. (1982) qui ne font pas état d'effet inhibiteur par l'éthanol au-dessous de 10%. Deux ans plus tard, Strehaiano (1984) suggère que le problème d'inhibition serait lié à d'autres métabolites excrétés par la levure tels que l'acétate, les alcools supérieurs (Maioresella et coll. 1983, Pampulha et Loureiro, 1989).

L'éthanol perturbe aussi le flux transmembranaire de protons, qui tend à tamponner le pH du cytosol. Ainsi, l'activité ATPasique est alors activée pour rétablir un gradient électrochimique entre le milieu cellulaire et extracellulaire, en dépensant plus d'énergie. Cette perte énergétique peut atteindre un niveau supérieur aux capacités cellulaires de compensation. Le cytoplasme s'acidifie alors et les perméases glucidiques deviennent inactivées : c'est l'arrêt de croissance (Leao et Van Uden, 1982)

Enfin, l'explication la plus probable est donnée par Charpentier (1993). Cet auteur explique le phénomène d'inhibition par la présence de sites d'action de l'éthanol dans les sites membranaires mitochondriaux et cytoplasmique. Ainsi, les molécules d'éthanol pénètrent à l'intérieur de la membrane cytoplasmique pour s'associer aux molécules d'acides gras des phospholipides en se substituant aux molécules d'eau. Ce comportement entraîne une altération de la fluidité et de la perméabilité membranaire, causant la mort cellulaire.

L'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance semble être accentué en présence de SO₂ alors que le SO₂ seul est peu actif.

1.6.2. Effet de l'acide acétique

L'acide acétique est un produit secondaire de la fermentation alcoolique produit en très faibles quantités pour une fermentation classique. Cependant, il peut être produit par certains micro-organismes (*Brettanomyces*) en quantités plus importantes ce qui est une des conséquences redoutées en cas de contamination pendant la fermentation.

En 1983 Maiorella et coll. ont montré que l'acide acétique dans une gamme comprise entre 0.5 à 9 g/L peut affecter la morphologie des levures *Saccharomyces* qui deviennent allongées et irrégulières. Plus tard, il a été montré que l'acide acétique est un fort inhibiteur de la croissance de *Saccharomyces* sous sa forme non dissociée (toxique). Cette inhibition étant plus marquée sur la synthèse de biomasse que sur la production de l'éthanol et indépendante du pH du milieu de culture (Pampulha et Loureiro, 1989; Phowchinda et coll. 1995).

Le mécanisme d'action de cet acide faible se situe au niveau de l'acidification du cytoplasme et de la modification de certaines enzymes de la glycolyse (Pampulha et Loureiro, 1990), particulièrement l'hexokinase (Dombek et Ingram, 1988).

Sur l'effet conjoint de l'éthanol et de l'acide acétique Pampulha et Loureiro (1989) ont observé que le pH interne est indépendant de la concentration en acide acétique dissocié et du pH externe. Par contre, il dépend de la concentration en acide acétique non dissociée. Alors, quand le pH interne décroît, la vitesse de fermentation diminue et devient nulle pour un pH interne de 4.8. Lorsque la concentration en éthanol est supérieure ou égale à 8%, l'inhibition est plus importante et elle devient complète pour un pH interne de 5.5.

D'autres auteurs ont souligné que l'acide acétique diminue la tolérance des levures à l'éthanol: par exemple, Ramos et Madeira, (1990), ont observé que la concentration critique en éthanol passe de 11% sans acide acétique à 0% pour 1% d'acide acétique.

1.6.3. Effet du dioxyde de soufre

Le dioxyde de soufre (SO_2) est le plus ancien additif utilisé en vinification. Le rôle principal du SO_2 est de sélectionner la flore fermentaire, les levures étant plus résistantes que les bactéries. Il est aussi un antioxydant et un solvant. La concentration de cet additif doit être bien contrôlée pour éviter des problèmes sur la qualité finale du vin (odeurs soufrées désagréables). Le dioxyde de soufre est une molécule qui peut se présenter sous différentes formes chimiques en fonction du pH du vin (**figure 1.4**). Des constantes de dissociation régissent le passage d'une forme à l'autre.

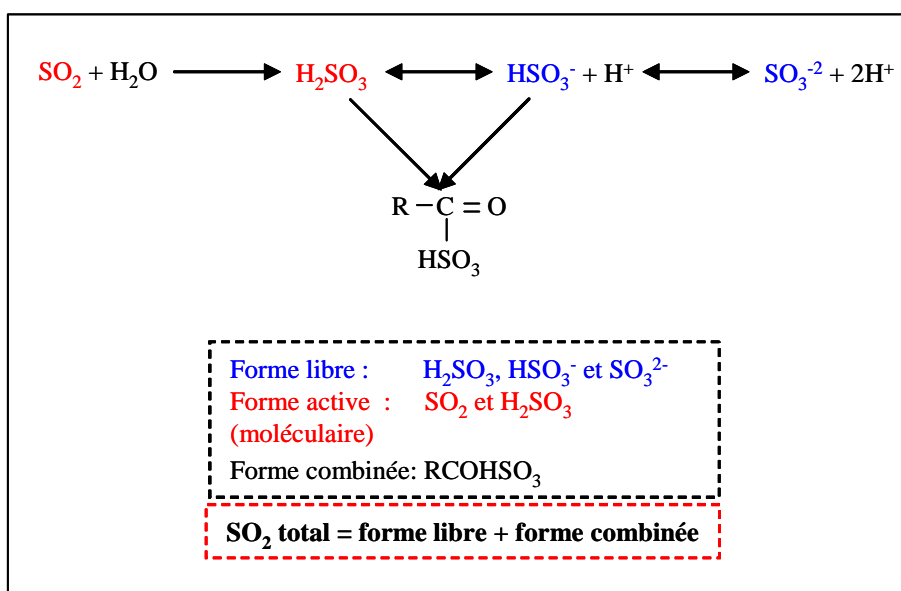


Figure 1.4. Les différentes formes de l'anhydride sulfureux

En 1982, Ripper démontrait que le dioxyde de soufre libre est la forme principale qui agit sur la croissance des micro-organismes, ce qui fût confirmé par Ingram (1984). Selon Macris et Markakis (1974) seule la forme H_2SO_3 de la partie libre est active vis-à-vis des levures. De même, Rehm et Wittmann (1962 et 1963) estiment que le SO_2 moléculaire (présent dans le SO_2 libre) est 100 à 500 fois plus actif que le dioxyde de soufre sous forme bisulfite. La forme de HSO_3^- (majoritaire dans le vin), se combine d'autant plus que le pH est élevé.

L'effet du pH sur l'action antimicrobienne du dioxyde de soufre a été étudié par Rahn et Conn (1944). Ils ont démontré que le SO₂ est totalement inefficace à pH neutre. De plus, l'action du dioxyde de soufre augmente lorsque la température augmente.

Le SO₂ combiné à des concentrations supérieures à 30 mg/L prolonge la phase de latence et limite la croissance dans le vin. A plus de 50 mg/L de SO₂ combiné ou de 100 à 150 mg/L de SO₂ total la croissance peut être complètement inhibée (Wibowo et coll., 1985). Un pH bas et une quantité élevée d'éthanol agissent de façon synergique avec le SO₂. Les levures peuvent également produire des sulfites pendant la fermentation alcoolique. Habituellement 10 à 30 mg/L de sulfite sont produits au maximum. La plupart des souches de *S. cerevisiae* en produisent moins de 10 mg/L. Néanmoins, il existe des souches qui produisent jusqu'à 100 mg/L (Alexandre et coll., 2003).

La résistance des souches de levures au dioxyde de soufre est connue pour être génétiquement déterminée et transmise aux générations suivantes, même en l'absence de dioxyde de soufre (Beech et Thomas, 1985). De plus, cette résistance va dépendre de l'espèce et de la souche de levures et par exemple, ces auteurs ont rapporté que *Saccharomyces ludwigii* et *Zygosaccharomyces bailii* peuvent supporter des concentrations en SO₂ supérieures à 500 mg/L. De manière plus générale, Romano et Suzzi (1992) ont établi une liste des levures de vinification tolérantes au dioxyde de soufre telles que : *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* et *Brettanomyces/Dekkera*. Concernant plus particulièrement l'espèce *Brettanomyces*, son comportement varie selon l'oxygène et la concentration du SO₂ ajouté au milieu de culture. Du Toit et coll. (2005) rapportent que des concentrations entre 0.25 et 0.35 mg/L de SO₂ moléculaire inhibent la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* après un jour d'incubation. Par contre, la présence d'oxygène diminue l'effet du SO₂ chez *Brettanomyces*.

Le mécanisme d'action antimicrobienne du dioxyde de soufre n'est pas complètement élucidé. En 1987, Ough et Crowell, ont proposé le mécanisme d'action suivant: le SO₂ pénètre dans la cellule par transport actif. Après, dans le cytosol, il peut directement se lier aux molécules carbonylées, les rendant inaptes à emprunter les voies métaboliques normales qui leur sont destinées. Une autre possibilité du dioxyde de soufre est de s'intégrer à la place du soufre dans les protides soufrés, ce qui les dénature (Yang, 1973). Finalement, la forme active du SO₂ diffuse librement dans la cellule et se

retrouve sous forme de HSO_3^- au pH interne qui est autour de 7 ce qui s'accompagne d'une accumulation de sulfite chargé qui réagit avec les constituants cellulaires et conduit à la mort cellulaire (Gunnison, 1981).

Cependant, ces mécanismes restent du domaine des hypothèses. Beech et Thomas (1985) résument les actions intra et extracellulaires du dioxyde de soufre de la manière suivante: limitation des substances nutritives et de l'oxygène, adsorption, peroxydation des lipides, inhibition de la glycolyse, destruction de la thiamine, dommages sur les protéines post-structurelles, élimination des intermédiaires des cofacteurs et des vitamines, transformation de l'ADN et de l'ARN, mutations (Dorange et Dupuy, 1972). Au niveau métabolique, le dioxyde de soufre agit en se combinant au glucose et à la dihydroxyacétone-P, au pyruvate et à l'acétaldéhyde, à l'acide oxaloacétique et à l'acide α -cétoglutarique.

1.7. Modélisation du métabolisme levurien

La modélisation consiste à créer une représentation simplifiée d'un problème: **le modèle**. Le modèle constitue une représentation possible du système pour un point de vue donné. On modélise toujours par rapport à un objectif. Suivant cet objectif, plusieurs modèles sont possibles pour décrire une même réalité. C'est pourquoi il importe de définir le cadre et le niveau de modélisation souhaité dès le début d'un projet. Généralement, l'objectif de la modélisation est de répondre à un (ou plusieurs) des trois besoins principaux: la compréhension des phénomènes, le contrôle et l'optimisation.

La croissance microbienne est un phénomène globalement très complexe par le nombre et la variété des réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis des conditions extérieures. Les modèles biologiques modernes cherchent à identifier, au-delà des corrélations, les liens de causalité susceptibles d'exister entre des phénomènes en apparence disjoints. Traditionnellement, on distingue deux grands groupes de modèles dans le domaine du génie microbiologique: **les modèles non-structurés** et **les modèles structurés**.

Les **modèles non-structurés** s'appuient sur une vision globale de la cellule, sans détailler sa structure (Pirt, 1988). Ainsi, la composition cellulaire est alors considérée comme constante et la notion de biomasse totale prime. Dans ce type de modèle, la variation de biomasse est exprimée par l'intermédiaire de variables extracellulaires distinctes (concentration en substrats, en produits du métabolisme et présence d'inhibiteurs de la croissance), ainsi que de certaines variables environnementales (pH, température, force ionique, etc...).

Les **modèles structurés** sont des expressions mathématiques qui prennent en compte la structure du micro-organisme (Esener et coll., 1982). Ces types de modèles sont généralement complexes et requièrent une connaissance précise du fonctionnement des différentes structures de la cellule. Ils entraînent de plus une multiplication des paramètres du modèle ce qui pose souvent des problèmes d'identification quand des données expérimentales de composés intracellulaires ne sont pas disponibles. Pour notre étude, nous écarterons ces types de modèles et nous nous intéresserons uniquement aux modèles non structurés.

La première étape de la modélisation du métabolisme levurien consiste à décrire l'évolution de la population microbienne en fonction du temps dans des conditions environnementales particulières. Dans les modèles non structurés qui considèrent la biomasse dans son ensemble, sans distinguer les différents états physiologiques des cellules, la croissance est caractérisée par des paramètres tels que le temps de latence et le taux de croissance. On parle couramment de **modèles primaires** (Augustin, 1996) par opposition aux modèles secondaires qui décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres des modèles primaires. Ainsi, un modèle reliant le taux de croissance d'un micro-organisme à la température, pH, etc., sera dit **secondaire**.

Avant de présenter les principaux modèles de croissance à l'origine de la plupart des travaux de modélisation, nous rappelons ci-après les principales étapes de la croissance d'une population microbienne et discutons sur la définition de la phase de latence.

1.7.1. Croissance microbienne en culture discontinue (batch)

1.7.1.1. Les étapes de la croissance

La croissance microbienne se traduit par une augmentation en taille ou en nombre des micro-organismes. Pour provoquer une croissance microbienne dans une culture il faut fournir aux cellules initiales les nutriments nécessaires et des conditions environnementales favorables. Le schéma de la croissance d'une population microbienne en culture discontinue (c'est-à-dire milieu non renouvelé) établi par Buchanan (1918) se décompose alors traditionnellement en sept phases distinctes (figure 1.5):

- 1) *La phase de latence* : elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parlé. Il s'agit d'une phase d'adaptation au nouvel environnement. Cette phase dépend soit de l'âge de l'inoculum, soit d'une adaptation enzymatique. Par ailleurs, dans certaines conditions, la concentration initiale en cellules est si faible qu'il est difficile de quantifier l'augmentation du nombre d'individus. Ce phénomène est considéré comme une *pseudo-latence*. La phase de latence peut être limitée en utilisant comme inoculum une préculture prélevée en phase exponentielle.
- 2) *La phase d'accélération* : elle commence à partir de l'adaptation effective des cellules à leurs nouvelles conditions de culture. Durant cette période, la valeur du taux spécifique de croissance (μ) augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale (μ_{\max}).
- 3) *La phase de croissance maximale ou exponentielle* : lorsque les concentrations microbiennes sont exprimées en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps, la pente de la droite correspond au taux spécifique maximal de croissance, μ_{\max} (h^{-1}):

$$\mu_{\max} = \frac{y_2 - y_1}{t_3 - t_2}$$

Dans cette phase le taux de mortalité est nul, l'activité métabolique est maximale et le taux de croissance est constant.

- 4) *La phase de décélération ou phase de freinage* : elle intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent. La population continue à croître mais le temps de génération augmente.
- 5) *La phase stationnaire maximale* : au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus ($\mu=0$) donc la population demeure stationnaire. Il y a un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules et le nombre de cellules qui meurent. Cette phase peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours.
- 6) *La phase de début de décroissance* : elle correspond à un début de disparition des cellules.
- 7) *La phase de décroissance exponentielle de la population* : cette phase apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des micro-organismes et entraîne leur mort rapide.

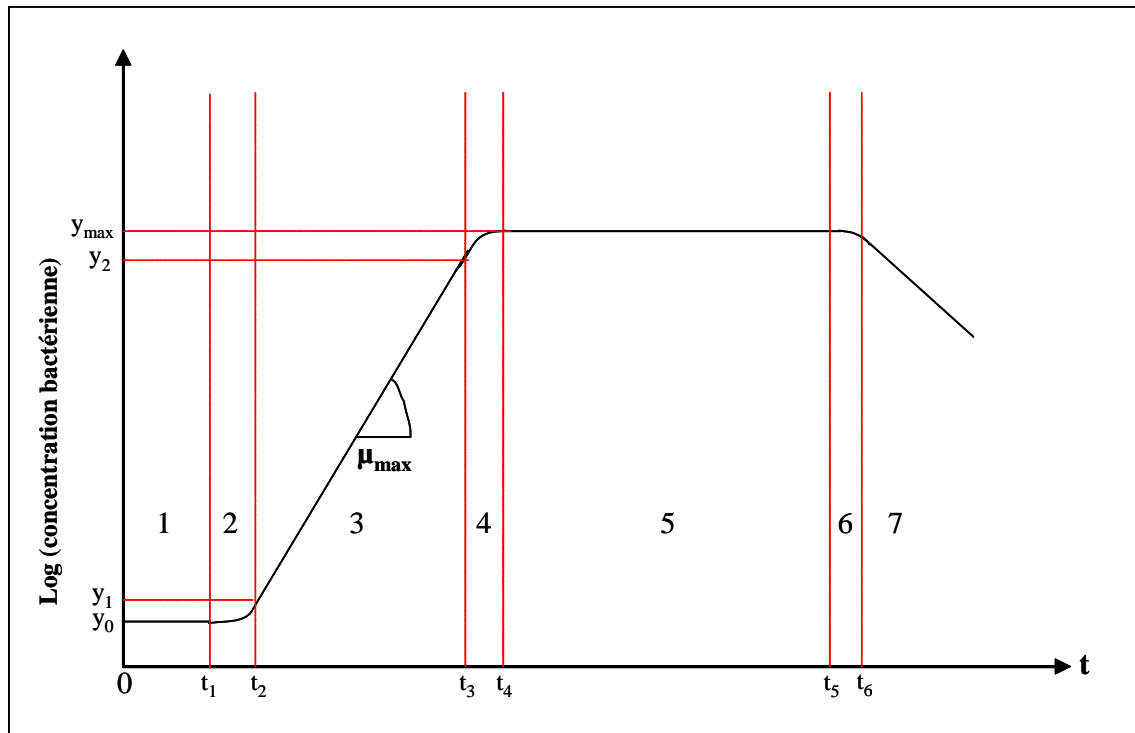


Figure 1.5. Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (batch) décrites par Buchanan (1918).

1.7.1.2. Phase de latence

Un phénomène inhérent à la cinétique microbienne est la phase de latence (λ). Il s'agit d'une réponse de la population microbienne observée lors du changement (soudain) de conditions environnementales. Le temps de latence est souvent considéré comme une période d'adaptation où les cellules se modifient afin de tirer profit du nouvel environnement et démarrer une croissance exponentielle (Buchanan et Klawitter, 1992).

- **Définition du temps de latence (λ)**

Ils existent différentes façons pour déterminer une valeur de temps de latence à partir de la mesure de l'évolution de la population microbienne.

- Buchanan et Solberg (1972) ont défini le temps de latence comme le temps nécessaire pour augmenter deux fois la densité de la population initiale ($\lambda=2X_0$).
- Pirt (1975) a défini la latence comme la période de transition où la vitesse spécifique de croissance (μ) augmente jusqu'à sa valeur maximum. Etant donné la forme typique d'une courbe sigmoïdale de croissance observée dans un

environnement constant (**figure. 1.6**), la durée du temps de latence (λ) peut être obtenue par l'intersection de la courbe extrapolée de la tangente de la phase exponentielle de la courbe de croissance, et du niveau de population initiale (N_0). Zwietering et coll. (1992) ont recommandé que cette définition soit employée systématiquement pour calculer le temps de latence afin de faciliter la comparaison des valeurs de la littérature. Cette définition est de nos jours la plus répandue. Cependant, elle est parfois difficilement applicable lorsque les courbes de croissance n'ont pas l'allure d'une sigmoïde parfaite. Il est alors difficile de tracer la 'tangente évidente' en phase exponentielle et suivant le tracé de celle-ci les valeurs des temps de latence peuvent être très différentes pour de mêmes données expérimentales.

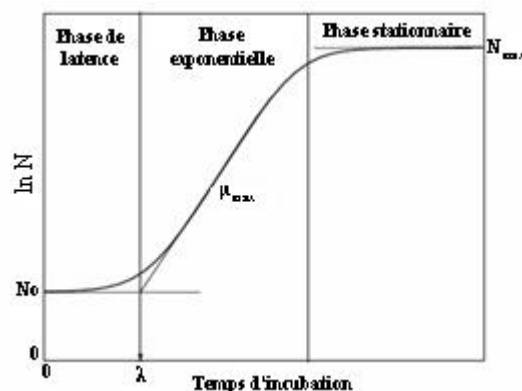


Figure 1.6. Profil de croissance typique pour des cellules après pré-incubation, à température constante.

- Buchanan et Cygnarowicz (1990) ont proposé une définition alternative pour calculer le temps de latence de la croissance bactérienne. Ils ont estimé le temps de latence comme le temps où le changement de la vitesse spécifique de croissance est maximal (**figure 1.7**). Ce temps correspond au premier point de la courbe du troisième dérivé de $\ln X$ en fonction du temps qui s'annule.

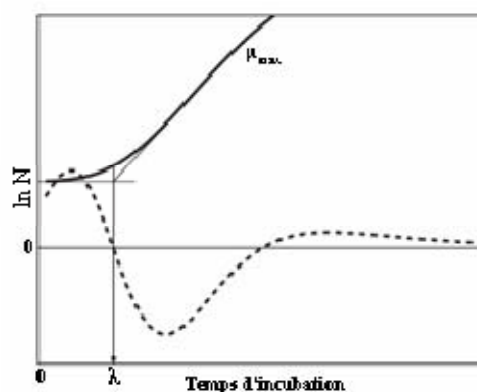


Figure 1.7. Comparaison entre le temps de latence conventionnel (_____) et la définition proposé par Buchanan et Cygnarowicz (1990) en utilisant la troisième dérivé de $\ln X$ (-----).

Comme nous le voyons, déterminer un temps de latence peut être délicat. Suivant la définition choisie, les valeurs obtenues peuvent être significativement différentes. A ces différences de définition, un autre paramètre jouant sur la valeur obtenue semble être la méthode utilisée pour quantifier la biomasse. Deux méthodes sont généralement employées :

- (1) La méthode standard est la mesure de comptage de cellules viables.
- (2) La deuxième méthode est basée sur des mesures d'absorbance ou de densité optique (DO).

Plusieurs auteurs (Bréand et coll., 1997 ; Hudson et Mott, 1994) ont comparé l'influence des deux méthodes sur le temps de latence. Ils ont obtenu systématiquement de plus faibles temps de latence lorsqu'ils ont utilisé la méthode de densité optique (DO). Cette différence sur la mesure entre la DO et le comptage des cellules viables peut s'expliquer par une augmentation de la taille des cellules et non du nombre pendant le temps de latence.

Les facteurs influençant la durée du temps de latence sont nombreux et variés : les variations de conditions environnementales ont une influence très importante mais la nature et le phénotype du microorganisme (Buchanan et Cygnarowicz, 1990), l'état physiologique des cellules (McMeekin et coll. 1993), la taille de l'inoculum (Augustin et coll. 2000) sont aussi des facteurs jouant un rôle important. Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'effet de variations de conditions environnementales telles que la température (Buchanan et Klawitter, 1992 ; Hudson, 1993 ; Zwietering et coll., 1994 ;

Whiting et Bagi, 2002), la vitesse de changement d'environnement (McKeekin et coll., 2002), le pH et l'activité de l'eau (Cheroute-Vialette et Lebert, 2002). Toutes ces études vont dans le même sens, plus les variations sont brusques et importantes plus les temps de latence sont longs.

1.7.2. Modélisation des cinétiques de croissance

De nombreux modèles primaires ont été développés pour représenter les croissances de population microbienne. Nous n'en citerons que deux, certainement les plus répandus.

- **Le modèle Logistique (Verhulst, 1838)**

En 1838 Verhulst propose une équation différentielle, afin de modéliser la croissance d'une population animale se stabilisant au cours du temps. Cette équation est connue sous le nom de loi Logistique. Elle repose sur l'hypothèse que l'accroissement relatif de la variable « y » modélisée décroît de façon linéaire avec elle.

$$\frac{dy}{dt} = a.y \left(1 - \frac{y}{k}\right) \quad (1.1)$$

A ce jour, les applications de cette loi sont généralisées, et couvrent à la fois les descriptions de croissance de cellules, d'organes ou d'organismes. En particulier, dans le cas de la description d'une cinétique de croissance de micro-organismes, elle prend la forme suivante, pour laquelle X représente la population microbienne et μ la vitesse spécifique de croissance :

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (1.2)$$

Le paramètre μ_{\max} est la vitesse spécifique de croissance maximale supposée atteinte dès le début de la culture. X_{\max} est appelé capacité limite du milieu. Cette capacité limite correspond à la population maximale qui est obtenue en fin de croissance, lors de la phase stationnaire.

Ce modèle simule la vitesse de croissance par des équations qui font intervenir uniquement le temps et la concentration en biomasse. Le modèle Logistique a été largement utilisé pour modéliser la croissance de micro-organismes tels que: *Xantamonas campestris* (Garcia-Ochoa et coll., 1990 ; Chin-Hang et Shang-Tian, 1990), *Pseudomans aeruginosa* (Venkata et coll., 1991), *Stresptococcus lactis* et *Stretococcus cremoris* en co-culture (Ramon-Portugal, 1991), (Ravaz, 1992), *Gluconobacter suboxydans* (Chandrashekar et coll., 1999), *Megasphaera elsdenii* (Soto-Cruz et coll., 2002).

- **Le modèle de Monod (Monod, 1942)**

Le modèle de Monod représente la base en matière de modélisation de la croissance microbienne. Il donne une relation entre la vitesse spécifique de croissance d'un micro-organisme, μ , et la concentration en substrat limitant, S .

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (1.3)$$

Cette équation dépend de deux paramètres :

- (1) la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max})
- (2) K_s , définie comme l'affinité que le micro-organisme a pour le substrat limitant. Sa valeur numérique correspond à la concentration en substrat nécessaire pour obtenir $\frac{1}{2} \mu_{\max}$.

Ces deux modèles représentent donc uniquement les étapes de croissance d'une population. Les phases de latence et de déclin ne peuvent être représentées par ces modèles. Si le déclin est rarement modélisée car généralement il se situe en fin de fermentation lorsque les produits d'intérêts ont déjà été formés, la phase de latence est elle plus intéressante à modéliser car elle se situe la plupart du temps en début de fermentation et a donc de l'importance sur la suite. La façon la plus répandue de modéliser cette phase est de rechercher une équation mathématique continue englobant latence et croissance. Ainsi, des fonctions sigmoïdales continues telles que l'équation modifiée de Gompertz (Zwietering et coll., 1990) ou le modèle de Baranyi et Roberts

(1994) ont été employées pour des courbes de croissance de levures ou bactéries. La plupart de ces modèles sont des modèles primaires nécessitant de déterminer des paramètres μ et λ . Les modèles secondaires proposés découlent de ces modèles primaires mais bien souvent l'influence des conditions environnementales est représentée uniquement sur les paramètres de croissance et pas sur les paramètres de latence.

1.7.3. Modélisation de la formation des produits

L'intervention d'un produit dans l'équation de description de la croissance microbienne nécessite l'expression de la dynamique propre de ces constituants. Ainsi, il est nécessaire d'écrire un système différentiel dans lequel sont décrites les évolutions de toutes les variables d'état qui interviennent dans l'équation de la vitesse de croissance. On obtient alors des systèmes dynamiques suivants :

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= F(X, P) \\ \frac{dP}{dt} &= F(X, P)\end{aligned}$$

Où X représente la concentration de biomasse et P la concentration de produit formé au cours de la culture.

En 1959 Luedeking et Piret, ont proposé une expression mathématique pour décrire la cinétique de production de métabolites au cours de la croissance. La forme générale de cette expression est la suivante :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (1.4)$$

Si l'on ramène à l'unité de biomasse et en notant $vp = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$ et $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$,

l'équation 1.4 est donc:

$$vp = \alpha\mu + \beta \quad (1.5)$$

Les cinétiques de formation des produits microbiens peuvent être alors divisées en trois groupes (Schügerl, 1985), qui correspondent chacun à un comportement métabolique différent (**Figure 1.8**). Ainsi, l'apparition d'un produit peut être :

1) **Liée à la croissance** quand le produit est formé simultanément à la biomasse. Dans ce cas, les vitesses spécifiques de formation du produit et de croissance sont proportionnelles.

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = v_p = \alpha \mu \quad (1.6)$$

Un exemple de ce type de cinétique est la production d'acide gluconique par *Gluconobacter oxydans* (Schügerl, 1990).

2) **Dissociée de la croissance** quand un métabolite est produit lors de la phase stationnaire alors que la vitesse de croissance est nulle. Cette fois, la vitesse spécifique de formation du produit est constante.

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = v_p = \beta \quad (1.7)$$

En particulier, les antibiotiques sont des exemples classiques de dissociation de ces deux activités métaboliques. Par exemple, la production de pristinamycines par *Streptomyces pristinaespiralis*. (Maung, 1987).

3) **Partiellement associée à la croissance** quand la formation du produit est présente lors de la phase de croissance et lors de la phase stationnaire. Ainsi, la vitesse spécifique de production peut être exprimée selon le formalisme mathématique complet proposé par Luedeking et Piret (1959) (équation 1.5).

$$v_p = \alpha \mu + \beta \quad (1.5)$$

La fermentation lactique par *Lactobacillus lactis* (Béal et coll., 1994), la production de gomme xanthane par *Xanthomonas campestris* (Chin-Han et Shang-Tian, 1990) la production d'acides gras volatils par *Megasphaera elsdenii* (Soto-Cruz et coll., 2002), sont représentatifs de l'association partielle croissance-production.

La **figure 1.8** présente les profils caractéristiques de croissance et de formation de produits pour chacun des groupes explicités ci-dessus.

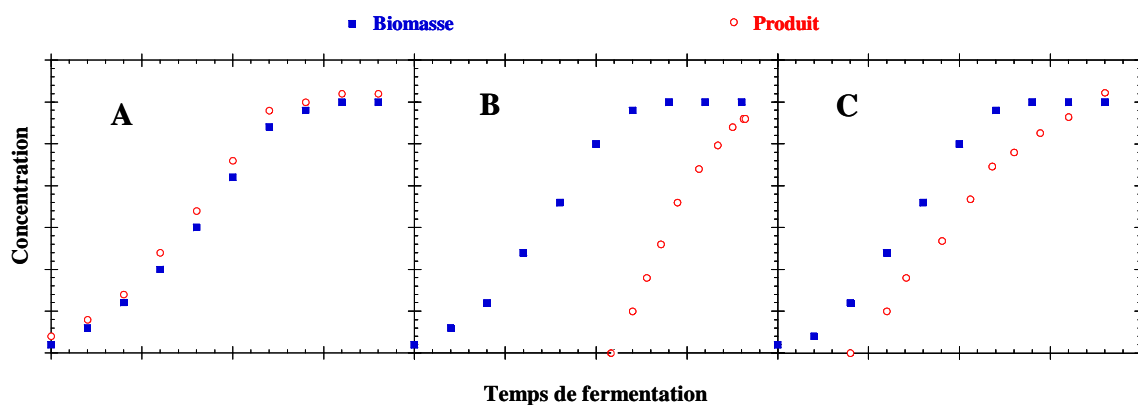


Figure 1.8. Exemples de cinétiques de croissance et de production pour une fermentation en batch : (A) production associée à la croissance, (B) production dissociée de la croissance et (C) production partiellement associée à la croissance.

1.7.4. Modèles de la microbiologie prédictive: les plans d'expériences

Pourquoi réaliser un plan d'expériences ?

Le succès actuel des plans d'expériences dans la recherche et l'industrie est lié au besoin de compétitivité des entreprises : ils permettent une amélioration de la qualité et une réduction des coûts. La méthodologie du plan d'expériences répond à des questions telles que :

- Quels sont les facteurs les plus influents ?
- Existe-t-il des interactions entre les facteurs (corrélations) ?
- Peut-on linéariser le processus en fonction de ces facteurs et le modèle ainsi obtenu est-il prédictif ?
- Comment minimiser le nombre de points de mesure du processus pour obtenir le maximum d'informations ?
- Existe-t-il des biais dans les résultats des mesures ?

Parmi les différents plans expérimentaux, les *plans factoriels* sont courants car ils sont les plus simples à mettre en œuvre et ils permettent de mettre en évidence très rapidement l'existence d'interactions entre les facteurs (X) qui sont les paramètres supposés influencer la réponse (Y) qui caractérise le comportement du phénomène étudié. Le traitement des résultats se fait à l'aide de la régression linéaire multiple et l'analyse de variance.

La régression linéaire multiple est une méthode d'analyse de données quantitatives. Elle a pour but de mettre en évidence la liaison pouvant exister entre une variable dite expliquée, que l'on notera Y et plusieurs autres variables dites explicatives que l'on notera X_1, X_2, \dots, X_k . L'analyse de variance permet de déterminer quels sont les facteurs dont l'influence est significative à un risque donné.

Le plan d'expériences a été utilisé par plusieurs auteurs pour déterminer l'effet des différents paramètres sur la croissance microbienne. Le **tableau I.5** ci-dessous montre quelques études:

Tableau I.5. Exemples de l'application de plan d'expériences pour différents micro-organismes.

Auteurs-année-micro-organisme	Plan d'expériences	Variables d'étude	Variables de réponse
Castro-Martinez C. et coll., (2005). <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .	Plan factoriel 3^2 .	Agitation et température.	Production d'acide acétique.
Chandrashekar P., et coll., (1999). <i>Gluconobacter suboxydans</i> .	Plan factoriel 2^2 complet composite centré avec 4 axes et 6 répétitions du point central.	Température et pH initial	Production d'acide tartrique.
Cheroutre-Vialette M. et Lebert A. (2000). <i>Listeria monocytogenes</i>	Un modèle combiné de 2 plans factoriels composites centraux. Chaque facteur est étudié à 5 niveaux.	Activité de l'eau et pH	Croissance
Gerbaux et coll., (2000). <i>Brettanomyces sp.</i>	Plan factoriel fractionnaire $2^{(4-1)}$.	pH, teneur en éthanol, température et taux de sucres résiduels.	Croissance et activité de <i>Brettanomyces</i> .
Martinez et coll., (2003). <i>Candida guilliermondii</i>	Plan factoriel 2^2 complet central composite.	pH et taux de dilution.	Production de xylitol à partir de betterave.
Medawar W., (2003).	Plan d'expériences composite centré à deux variables.	Concentration initiale en éthanol et concentration	Temps de latence, accroissement maximal de la

<i>Brettanomyces intermedius</i>		initiale en SO ₂ .	population, vitesse spécifique de croissance maximale
Moreau (2000) <i>Brevibacterium linens</i>	Plan d'expériences à 4 axes.	Variations des substrats purs et mixtes. Température, pH et oxygène dissous.	Croissance.
Palmqvist E., et coll. (1999) <i>Candida shehatae</i> NJ23 et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Plan factoriel 2 ³ complet avec 3 points centraux.	Acide acétique, furfural, et acide p-hydroxy-benzoïque.	Croissance des levures et productivité en éthanol.
Ramon-Portugal (1995) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 522D	Plan d'expériences complet à deux niveaux	Température et pH	paramètre α (de loi logistique modifiée) =effet toxique d'une protéine killer K2
Serra et coll., (2005) <i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>uvarum</i>	Plan factoriel à 2 niveaux.	Température et pH	Croissance

1.7.5. L'analyse factorielle de données pour la construction d'un modèle stoechiocinétique.

Comme nous l'avons déjà dit, la modélisation se fait toujours par rapport à un objectif. Les modèles précédemment présentés, que ce soit les modèles logistiques, de Luedeking et Piret ou les régressions linéaires multiples issues des plans d'expériences, permettent de représenter des valeurs expérimentales par des équations mathématiques, éventuellement de prédire des comportements, mais ils n'expliquent pas les phénomènes biologiques observés. Il est très difficile voir impossible à partir de ceux-ci d'émettre des hypothèses sur les voies métaboliques des microorganismes qui sont actives ou non.

Si un de nos objectifs est de mieux comprendre le métabolisme de *Brettanomyces*, il est nécessaire de s'intéresser à d'autres types de modèles. Les modèles dits stoechiocinétiques permettent une analyse des données expérimentales qui peut déboucher sur l'établissement d'un schéma réactionnel apparent. Tout en restant à l'échelle extracellulaire, et donc avec des informations expérimentales relativement facile à obtenir, ils permettent de déduire certaines informations liés au métabolisme interne de la cellule. Nous allons voir ci-dessous les méthodes qui ont été développées pour obtenir ce type de modèles. Elles reposent toutes sur l'analyse factorielle de données cinétiques de fermentation.

1.7.5.1. Formulation du problème

L'analyse factorielle de données en fermentation (réacteur discontinu) est fondée sur une exploitation de la structure algébrique du bilan matière partiel. Chaque constituant évolue dynamiquement en fonction de l'intensité des réactions dans lesquelles il est impliqué soit comme réactif, soit comme produit. Son évolution globale est donc écrite dans le bilan matière partiel comme la somme des contributions de chaque réaction. En effet, le bilan matière sur un constituant, en l'absence d'alimentation ou soutirage, décrit la variation de nombre de mole dn_e du constituant e dans le réacteur pendant le temps dt :

$$\frac{dn_e}{dt} = \sum_{r=1}^{nr} \gamma_e^r v_r(t) \quad (1.8)$$

avec

γ_e^r coefficient stoechiométrique du constituant e dans la réaction r .

$v_r(t)$ vitesse de la réaction r (définie par rapport au constituant clé tel que $\gamma_c^r = 1$).

nr le nombre de réactions.

L'intégration de l'équation (1.8) à partir de l'instant initial t_0 donne:

$$dn_e = n_e(t) - n_e(t_0) = \sum_{r=1}^{nr} \gamma_e^r \int_{t_0}^t v_r(t).dt = \sum_{r=1}^{nr} \gamma_e^r y_r(t) \quad (1.9)$$

avec

y_r avancement de la réaction r au temps t .

Si $n+1$ mesures des rétentions molaires sont effectuées aux instants (t_0, t_1, \dots, t_n) , alors, un total de n variations de rétentions molaires, d_e^i ($i = 1, n$) sont calculées par la relation (1.9) développée entre l'instant initial et les instants d'échantillonnage:

$$d_e^1 = n_e(t_1) - n_e(t_0) = \sum_{r=1}^{nr} \gamma_e^r y_r(t_1)$$

.....

.....

$$d_e^n = n_e(t_n) - n_e(t_0) = \sum_{r=1}^{nr} \gamma_e^r y_r(t_n) = \sum_{r=1}^{nr} \gamma_e^r y_r^n$$

ce qui peut être traduit en représentation matricielle par:

$$d_e^1 = \begin{bmatrix} y_1^1 & \dots & y_{nr-1}^1 & \dots & y_{nr}^1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \gamma_e^1 \\ \dots \\ \gamma_e^{nr-1} \\ \gamma_e^{nr} \end{bmatrix}$$

.....

$$d_e^n = \begin{bmatrix} y_1^n & \dots & y_{nr-1}^1 & \dots & y_{nr}^1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \gamma_e^1 \\ \dots \\ \gamma_e^{nr-1} \\ \gamma_e^{nr} \end{bmatrix}$$

et qui équivaut à:

$$\begin{bmatrix} d_e^1 \\ d_e^n \end{bmatrix} = Y \cdot \begin{bmatrix} \gamma_e^1 \\ \dots \\ \gamma_e^{nr-1} \\ \gamma_e^{nr} \end{bmatrix} \quad (1.10)$$

où Y est la matrice regroupant les vecteurs lignes détaillés ci-dessus.

La relation (1.10) généralisée à l'ensemble des nc constituants mesurés, conduit à la notation matricielle suivante:

$$\mathbf{D} = \mathbf{Y} \mathbf{N} \quad (1.11)$$

Où

D [n, nc]	est la matrice des variations de rétentions molaires
Y [n, nr]	est la matrice des avancements de réaction
N [n, nc]	est la matrice des stœchiométries de réaction

L'application de l'analyse factorielle sur des données cinétiques cohérentes permet de retrouver chacun de ces termes: la part de chaque réaction dans la qualité globale de matière consommée ou produite. Chaque terme est composé d'un coefficient stœchiométrique constant et d'un avancement de réaction fonction du temps. Cette méthode n'introduit aucune hypothèse sur les lois de vitesse, donc aucun paramètre. Elle utilise simplement la structure bilinéaire des équations de bilan.

La matrice D étant généralement une matrice de données construite à partir des valeurs expérimentales, deux problèmes surviennent fréquemment. Premièrement la matrice D contient l'erreur de mesure sur les constituants. Ce bruit perturbe donc la recherche de la décomposition de D en deux matrices Y et N puisqu'il met en défaut le principe de linéarité des bilans.

Par ailleurs, cette décomposition n'est pas unique et il existe une infinité de solutions à la décomposition car toute matrice carrée T, non singulière de dimension nr, donne une décomposition équivalente :

$$\mathbf{D} = (\mathbf{Y} \mathbf{T}^{-1}) (\mathbf{T} \mathbf{N}) = \mathbf{Y} \cdot \mathbf{N} \quad (1.12)$$

Les différentes méthodes que nous allons détailler essayent chacune de résoudre ces deux problèmes.

1.7.5.2. L'analyse factorielle en fermentation

La première adaptation de l'analyse factorielle pour le traitement de données de fermentation en réacteur discontinu est due à Hamer (1989). Il démontre l'intérêt qu'apporte une vision de la croissance bactérienne décomposée en un jeu de réactions simples, associée à une stœchiométrie invariante dans le temps. Les avancements de réaction trouvés lui permettent de comprendre le comportement du micro-organisme sans information additionnelle sur la cinétique.

Sa méthode est basée sur une décomposition de la matrice D (bruitée) par ses valeurs singulières (décomposition non unique). Il s'affranchit de l'erreur de mesure en divisant les colonnes de D par l'erreur de mesure de chaque constituant. La matrice des valeurs singulières extraites est alors analysée de façon un peu hasardeuse: il supprime les valeurs singulières de plus faibles amplitudes, sous l'hypothèse qu'elles sont générées par le bruit de mesure, et en valeurs singulières conservées, par la matrice D, lui fournit des avancements de réaction. Les stœchiométries et avancements ainsi trouvés ne peuvent donc pas être interprétés de façon physique (avancements de réactions négatifs). Il propose alors une méthode graphique basée sur des rotations et des redimensionnements pour trouver des stœchiométries ayant un sens physique, et en déduire des avancements positifs. Cette méthode ne peut pas s'appliquer dans le cas d'un schéma réactionnel comportant plus de deux équations.

En 1990 Bonvin et Rippin, ont évolué l'idée de Hamer en généralisant l'approche. Ils utilisent l'analyse factorielle pour déterminer le nombre de réactions concurrentes, puis appliquent la méthode dite de la réaction cible. La stœchiométrie ciblée (proposée par le spécialiste de la réaction) est testée par projection sur l'espace des solutions possibles. Dans le cas où l'écart entre la projection et la cible est trop important, la réaction proposée est rejetée. Cette méthode est fortement perturbée par les erreurs de mesure. Aussi dans le cas de données bruitées, ils incorporent de la connaissance dans la matrice des stœchiométries afin de réduire l'influence du bruit dû aux erreurs de mesure. Cela consiste à éliminer des données initiales la contribution des réactions connues. En procédant par étapes successives, la contribution de toutes les réactions est finalement scrutée.

Harmon et coll., (1995) généralisent la méthode de la réaction cible. L'extraction des avancements de réaction et des stœchiométries est basée sur l'analyse et la comparaison de plusieurs jeux de données, qui diffèrent par l'occurrence d'une réaction.

Enfin, Fillon (1996) a testé la méthode de la réaction cible avec intégration de la connaissance sur plusieurs jeux de données. Il conclut que la qualité de la méthode dépend énormément de celle des mesures, en particulier au niveau de la recherche du nombre de réactions occurrentes. Seule une borne supérieure, fixée par la loi de Gibbs (Aris et Mah, 1963) peut être utilisée. Un traitement préalable de la qualité des données expérimentales est alors obligatoire. Fillon préconise de n'utiliser ces méthodes que dans deux cas de figure précis, où elles sont alors efficaces:

- Le schéma réactionnel est connu, c'est la détermination des réactions actives et la forme des lois de vitesse qui sont cherchés.
- L'évolution du nombre de réactions actives est connue, et l'on cherche la valeur des coefficients stœchiométriques. Il faut se donner le nombre de réactions et proposer un schéma (une matrice N théorique) qui peut être testé. La méthode consiste à rechercher les composantes de la matrice T telles que les erreurs commises entre les composantes de la matrice $T.N$ de la formule (1.13) et les coefficients d'un schéma proposé a priori soient minimales.

$$\min_T \|N_{théorique} - TN\| \quad (1.13)$$
$$D = (YT^{-1})(TN)$$

1.7.5.3. Méthode d'analyse factorielle appliquée à la recherche de stœchiométries de réaction.

Cette méthode a été établie par Moreau (2000) pour l'étude sur les cinétiques et modélisation de *Brevibacterium linens*. Le raisonnement de cet auteur s'appuie sur les conclusions de Fillon (1996). Puisque les méthodes proposées dans la littérature ne permettent pas de trouver à la fois le nombre de réactions occurrentes, la matrice des stœchiométries et les avancements de réactions, alors elle propose un schéma

réactionnel à partir de la connaissance expérimentale, et l'optimisation de la recherche des coefficients stœchiométriques de manière à ce que la solution finale ait un sens physique.

Moreau (2000) propose une nouvelle formulation, qui évite de travailler sur une matrice T abstraite (équation 1.13). Il s'agit, par résolution d'un problème d'optimisation sous contraintes, de minimiser les différences entre la matrice D expérimentale et la matrice D théorique, calculée à partir de la matrice Y des avancements et de la matrice des stœchiométries proposées. Le critère choisi pour la minimisation des écarts entre D_{exp} et D_{calc} est la somme des erreurs absolues au carré pondérée par la mesure maximale de chaque constituant considéré :

$$\min_{Y,N} \|D_{\text{exp}} - D_{\text{calc}}\| \quad (1.14)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} y_{i,j} > 0 \text{ et } y_{i+1,j} - y_{i,j} > 0 \text{ pour } i = 1, n \text{ et } j = 1, nr \\ N \text{ respecte les bilans élémentaires} \\ D_{\text{calc}} = YN \end{array} \right\}$$

$$\text{Avec } \|D_{\text{exp}} - D_{\text{calc}}\| = \sum_i \sqrt{\frac{\sum_j (D_{i,j,\text{exp}} - D_{i,j,\text{calc}})^2}{\text{Max}(|D_{i,j,\text{exp}}|)}} \quad (1.15)$$

Cette formulation présente plusieurs avantages, notamment par le fait de pouvoir ajouter deux contraintes au problème précédent :

- Les avancements trouvés sont tous positifs, ainsi que leur dérivée par rapport au temps.
- La matrice des stœchiométries respecte les bilans élémentaires.

La solution trouvée est alors nécessairement une solution physiquement acceptable (en particulier pour le cas des avancements de réaction, ce qui n'était pas le cas lors de la formulation précédente (équation 1.13).

La simplicité de la mise en œuvre de cette méthode, permet de travailler par exemple avec le solveur d'Excel (méthode SQP). En revanche, pour pouvoir utiliser cette

méthode, il ne faut pas avoir d'incertitudes sur le nombre de réactions occurrentes. Le schéma métabolique doit être connu, et seuls les coefficients stœchiométriques et les avancements sont cherchés. En outre, si le nombre de coefficients stœchiométriques et d'avancements de réactions à déterminer est très important, la résolution numérique du problème d'optimisation peut être une limitation. Il faut dans tous les cas essayer de minimiser ces inconnues à identifier en intégrant au maximum la connaissance du système étudié.

1.8. Conclusions de l'étude bibliographique

L'étude bibliographique avait pour but de montrer les travaux réalisés sur le genre *Brettanomyces*. La majeure partie des publications de la littérature sont surtout focalisées sur les aspects de contamination en vinification (production des éthylphénols) (Chatonnet et coll., 1995; Larue et coll., 1991; Pretorius, 2000...) et dans la production d'alcool industriel (Maiorella et coll., 1984 ; De Miniac, 1989; Délia-Dupuy et coll., 1993). Très peu d'études s'intéressent à l'effet des facteurs environnementaux sur le métabolisme et les aspects cinétiques de cette levure. Notre objectif sera d'étudier les effets des paramètres environnementaux sur deux aspects différents :

Dans un premier temps, d'un point de vu œnologique, nous nous intéresserons à montrer l'effet des paramètres environnementaux (pH, température, concentration en éthanol et concentration en dioxyde de soufre) sur la croissance de *Brettanomyces*. Des modèles mathématiques basés sur la méthodologie des plans d'expériences seront proposés pour simuler la croissance des souches et de cette manière pouvoir prédire l'évolution de ce micro-organisme au cours du temps. Dans la littérature, uniquement deux études ont été réalisées sur l'effet de tels paramètres. Tout d'abord, Gerbaux et coll., en 2000 ont étudié l'effet du pH, de la teneur en éthanol et de la température sur la croissance et l'activité des *Brettanomyces*. Pour ce faire, ils ont utilisé un plan d'expérience fractionnaire 2^{4-1} . D'autre part, en 2003, Medawar a étudié l'effet de l'éthanol et du SO_2 sur la croissance et la phase de latence de cette levure. Il a appliqué un plan d'expériences composite centré à deux variables. Ces travaux constituent un bon point de départ pour nos travaux et ils pourront être confrontés avec nos résultats.

Dans un second temps, en ce qui concerne l'aspect métabolique, nous étudierons l'effet de la température et du pH sur la croissance de *Brettanomyces* et la production d'éthanol et d'acide acétique. Nous nous efforcerons dans un premier temps de réaliser une étude cinétique de l'influence de ces paramètres et de dégager quelques premières connaissances sur le métabolisme de cette levure au travers le formalisme de Luedeking et Piret. Cette première étude permettra d'emmagasiner de la connaissance utile pour l'application à nos données cinétiques de la méthode de l'analyse factorielle proposée par Moreau en 2000. Ainsi nous proposerons au final un schéma réactionnel du métabolisme du glucose de *Brettanomyces*.

Chapitre II:
Matériels et Méthodes

CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Les micro-organismes

Dans ce travail, nous avons utilisé les souches suivantes:

Souche	Origine	
	Vin	Distillerie
<i>B. bruxellensis</i> (B5d) ^a		X
<i>B. bruxellensis</i> (TP1) ^b	X	
<i>B. bruxellensis</i> (B1) ^c	X	
<i>B. bruxellensis</i> (B2) ^c	X	
<i>B. bruxellensis</i> (B4) ^c	X	

- a) Souche de levure isolée lors de contaminations de fermentations alcooliques sur une installation industrielle (distillerie). Cette souche a été identifiée comme *Brettanomyces bruxellensis* (forme imparfaite du genre *Dekkera*) par l'IHEM (Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie-Mycologie de Bruxelles). Elle est répertoriée à l'IHEM sous le numéro 6037.
- b) La souche *Brettanomyces bruxellensis* TP1 a été isolée de moûts de raisin en fermentation alcoolique et son identification a été confirmée par P.C.R.
- c) Les souches *B. bruxellensis* (B1), *B. bruxellensis* (B2) et *B. bruxellensis* (B4) ont été isolées dans notre laboratoire à partir de moûts ou de vins d'une cave du sud-ouest de la France (Buzet 2). Les techniques d'identification génétique (PCR, Electrophorèse en Champ Pulsé) permettent de préciser l'identité des souches. Ces travaux d'identification ont été réalisés à l'IDAC de Nantes.

2.2 Les milieux de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés selon les objectifs poursuivis. Dans tous les cas le pH est ajusté avant la stérilisation avec l'acide orthophosphorique à 85% et le milieu de culture est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes pour les erlenmeyers et 20 minutes pour les fermenteurs.

2.2.1 Milieu de conservation

Les souches *Brettanomyces bruxellensis* ont été conservées à 4°C et repiquées à intervalles réguliers (2 mois) sur le milieu gélosé suivant:

Composé	Concentration (g/L)
Agar-agar	20
Glucose	20
Extrait de levure	10

2.2.2 Milieu de fermentation

Deux milieux de fermentations ont été utilisés: milieu synthétique minimum et milieu synthétique type vin.

2.2.2.1 Milieu synthétique minimum (chapitre 4 et 5)

C'est le milieu synthétique minimum proposé par Strehaiano (1984). Ce milieu a été utilisé pour l'étude sur le métabolisme de *Brettanomyces*. Sa composition est la suivante:

Constituant	Concentration (g/L)
Glucose	50.0
KH ₂ PO ₄	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4
Extrait de levure	1.0

2.2.2.2 Milieu synthétique type vin (chapitre 3)

a) Milieu synthétique type vin pour pré-levain:

Constituant	Concentration (g/L)
Glucose	20.0
Acide citrique	0.3
Acide tartrique	2.0
Acide malique	3.0
KH ₂ PO ₄	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4
Extrait de levure	1.0

Le pH est ajusté à 3.5.

b) Milieu synthétique type vin pour levain:

Constituant	Concentration (g/L)
Glucose	20.0
Acide citrique	0.3
Acide tartrique	2.0
Acide malique	3.0
KH ₂ PO ₄	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4
Glycérol	3.0
Extrait de levure	1.0
Ethanol*	30.0

Le pH est ajusté à 3.5.

c) Milieu synthétique type vin utilisé pour l'étude du choix de la souche et de l'influence des paramètres environnementaux (plan d'expériences)

Constituant	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Fructose	10.0
Acide citrique	0.3
Acide tartrique	2.0
Acide malique	3.0
KH ₂ PO ₄	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4
Glycérol	6.0
Extrait de levure	0.5
Ethanol	*
Dioxyde de soufre	*

* Différentes concentrations d'éthanol et de dioxyde de soufre ont été ajoutées dans le milieu selon les besoins de la série d'expériences. Ces composés préalablement stérilisés par filtration sont ajoutés après stérilisation.

2.3 Déroulement des fermentations

2.3.1 Préculture

Les levures sont réactivées par une préculture. Le but de la préculture est de diminuer la phase d'adaptation du micro-organisme dans le milieu au début de la fermentation. Cette préparation se fait en 2 étapes de 35 heures chacune (prélevain, levain) en erlenmeyer de 500 mL contenant 250 mL de milieu synthétique. La première permet d'habituer la souche au milieu et la deuxième est utilisée pour ensemençer le milieu d'étude à $3 \cdot 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ en fin de phase de croissance (**Figure 2.1**). Le pH a été ajusté à 4.0 au début de la fermentation avant la stérilisation. La température a été régulée à 30°C par un bain marie et l'agitation a été fixée à 250 tours/min.

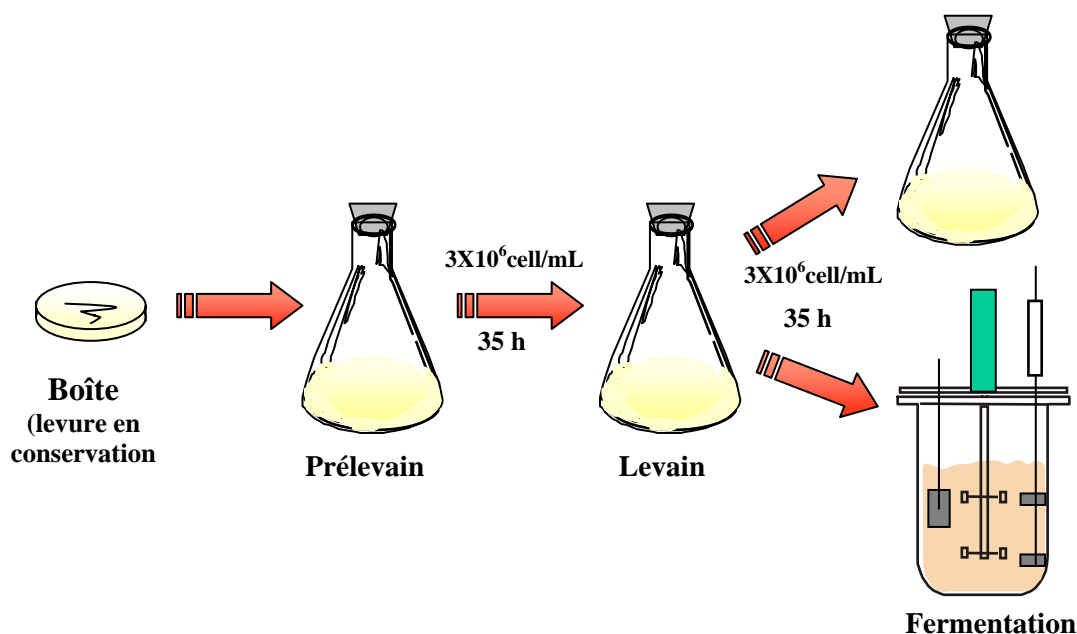


Figure 2.1. Préparation de l'inoculum en deux étapes successives.

2.3.2 Cultures en batch

Les cultures en batch ont été réalisées en erlenmeyer et en fermenteur. Les expériences sur l'effet des paramètres environnementaux (chapitre 3) ont été faites en erlenmeyer. Pour l'expérience sur le métabolisme de *Brettanomyces* nous avons utilisé les fermenteurs (chapitre 4 et 5).

2.3.2.1 Erlenmeyer

Les cultures en erlenmeyer sont réalisées avec un volume de travail de 300 mL (500 mL volume total). Les fioles sont fermées par un bouchon d'ouate doublé de papier aluminium resserré après chaque prélèvement. La température est fixée à 30°C pour les expériences sur la tolérance à l'éthanol. L'agitation est fixée à 250 tours/min.

2.3.2.2 Fermenteur

Deux types de fermenteurs ont été utilisés: marque fermenteurs Sétric de type « SET2 » et fermenteurs New Brunswick « BioFlo 110 ».

a) Fermenteur de marque Sétric de type « SET 2 » (Figure 2.2)

Ces fermenteurs sont d'une capacité de 2 litres avec un volume utile de travail de 1.6 litres. Ils sont munis d'une agitation mécanique et de régulation de température. Ils sont équipés de condenseurs pour la sortie de gaz. L'aération a été contrôlée par un manodétenteur associé à un rotamètre.

Pour les essais, une agitation de 250 tours/min a été fixée, un apport d'oxygène de 0.1 vvm ($k_L a$ 6.0 h⁻¹) est réglé et un pH initial de 4.0 a été fixé. La température a été modifiée entre 15 et 35°C (chapitre 4, section 4.1).

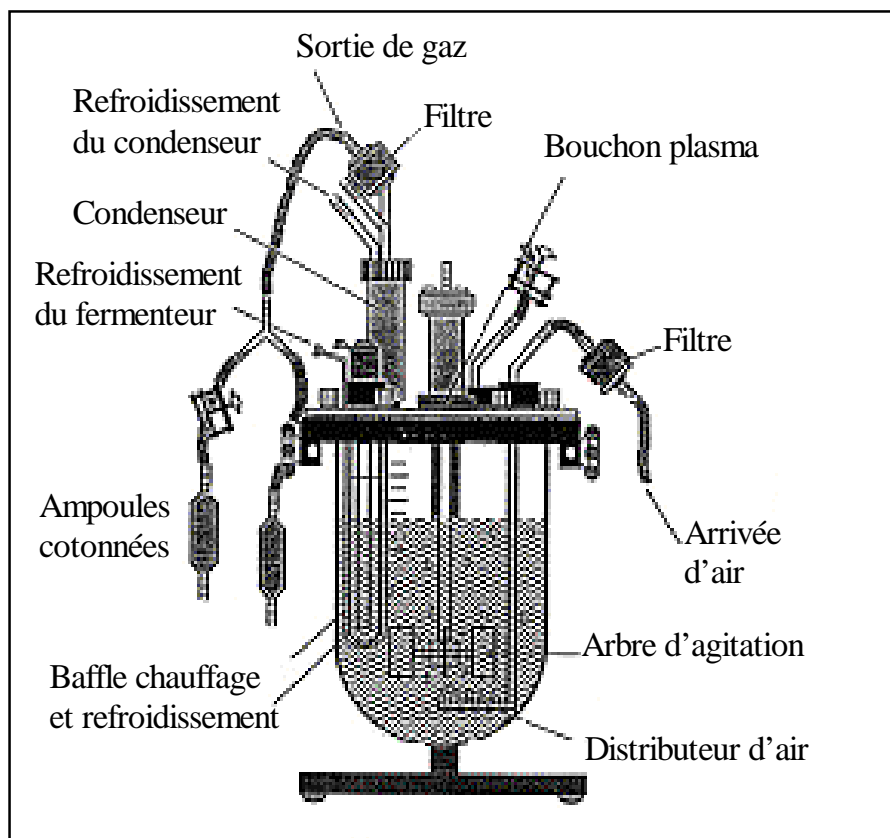


Figure 2.2. Fermenteur Sétic de type « SET 2 »

b) Fermenteur de marque New Brunswick « BioFlo 110 » (Figure 2.3)

Nous avons aussi travaillé avec une série de 4 fermenteurs de 3 litres avec un volume utile de travail de 2 litres. Ces fermenteurs ont été utilisés pour étudier le métabolisme de *B. bruxellensis* (chapitre 4 et 5).

Le fermenteur est composé d'une cuve en verre à fond rond et d'une platine en acier inoxydable. Le mécanisme d'agitation est constitué de deux turbines type Rushton, il est connecté par accouplement magnétique au moteur d'agitation. Le système d'aération consiste en un distributeur de gaz placé au-dessous des turbines.

Ce réacteur BioFlo 110 est équipé des dispositifs suivants.

- Unité de commande primaire multi-langue (PCU) qui contrôle et indique jusqu'à 32 paramètres du processus et peut enregistrer et suivre les données de 4 fermenteurs connectés en série.
- La température est mesurée avec une thermo sonde dans un doigt de gant. Le contrôle de la température se fait par le contrôle P-I-D et en utilisant une couverture de chaleur et un circuit d'eau réfrigéré.

- La vitesse d'agitation est régulée par l'unité de commande primaire (PCU) dans une gamme de 0 à 1200 tours/min.
- Le contrôle de pH est réglé avec le système P-I-D. Pour mesurer la valeur du pH, une sonde de platine est introduite dans le fermenteur. L'ajout d'acide ou base est possible avec des pompes péristaltiques.
- L'oxygène dissous dans le milieu de culture est mesuré par une sonde à pression partielle en oxygène (Ingold O₂ probe).
- La mesure du débit gazeux d'entrée est effectuée par l'intermédiaire d'un débitmètre massique.
- Un condenseur est mis en place à la sortie du fermenteur pour éviter les pertes importantes de produits volatils durant les fermentations. L'eau de refroidissement est à 15°C environ.
- La concentration en oxygène et la concentration en dioxyde de carbone dans le gaz de sortie sont mesurées avec un analyseur d'oxygène paramagnétique et un analyseur IR CO₂ (SERVOMEX 4100 Analyseur de Pureté du Gaz) connecté à la sortie du bio-réacteur.

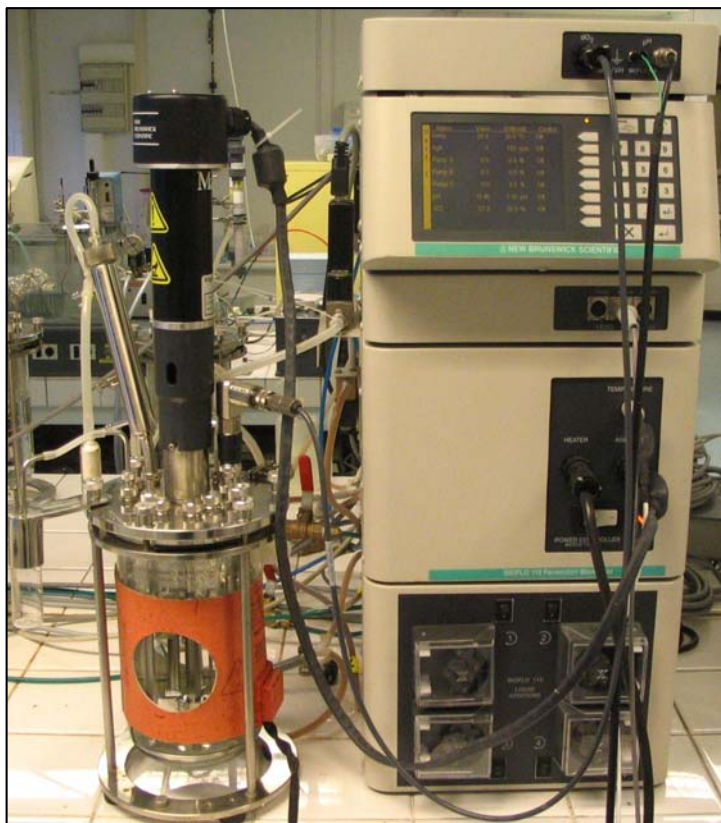


Figure 2.3. Fermenteur « BioFlo 110 » (New Brunswick)

2.3.3 Protocole de prélèvement des échantillons

Avant leur analyse les échantillons prélevés tout au long des fermentations ont suivi le même protocole général représenté sur la **figure 2.4**.

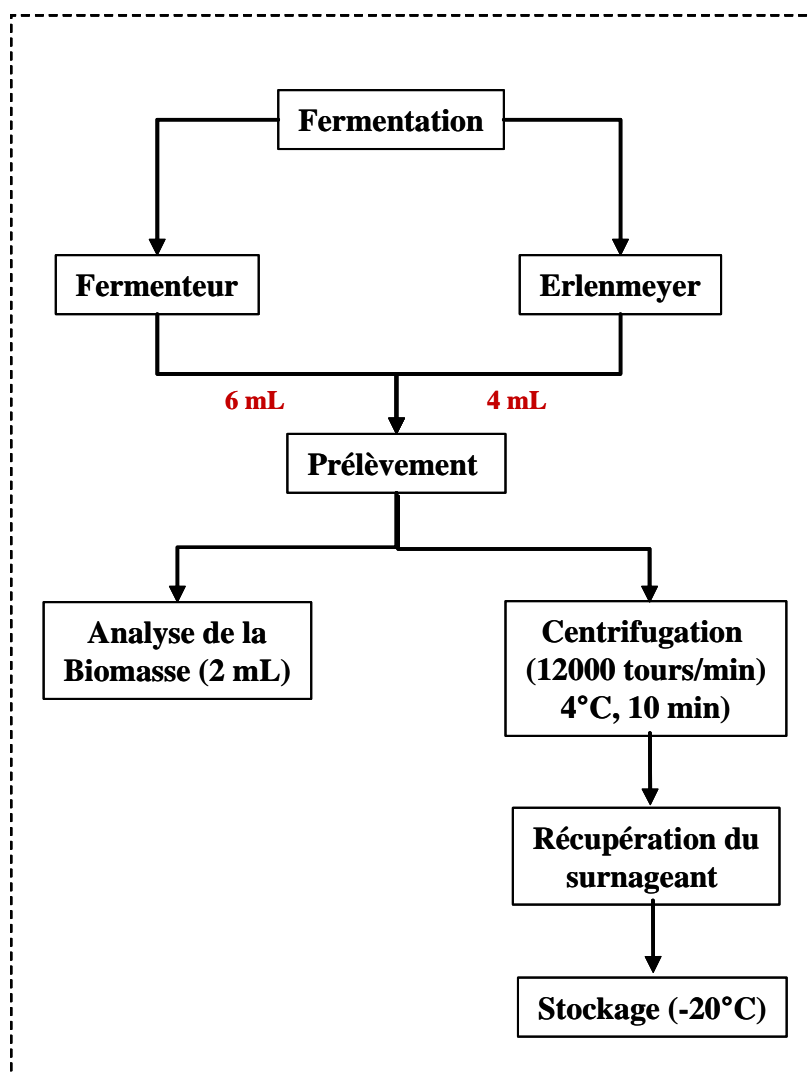


Figure 2.4. Protocole de prélèvement des échantillons

2.4 Les méthodes analytiques

2.4.1 Analyse de la biomasse

Le suivi de la biomasse a été fait par trois méthodes différentes. Ces méthodes apportent des informations complémentaires et leur combinaison augmente la fiabilité de nos résultats. Le suivi de la biomasse a été effectué tout au long des fermentations.

2.4.1.1 Spectrophotométrie (Turbidimétrie)

La densité optique (DO) mesurée traduit le pourcentage de lumière non transmise par la suspension de levures. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de biomasse présente dans l'échantillon. La DO a été mesurée avec un spectrophotomètre modèle Hitachi® U-2000TM équipé du monochromateur Seya-Namioka®. Les mesures ont été réalisées dans des cuves en verre de 2 mm de trajet optique. Des dilutions sont effectuées afin de rester dans la gamme de linéarité ($DO < 0.8$).

2.4.1.2 Méthode gravimétrique (Poids sec)

Cette méthode a pour but d'estimer la masse de levures contenue dans un volume donné de l'échantillon. Elle est basée sur la différence de poids sec d'une membrane de porosité déterminée (Sartorius®, acétate de cellulose, 0.45 μ m) avant et après filtration (et séchage) d'un volume connu (25 et 10 ml) d'échantillon. La biomasse sèche est exprimée en g/L. Cette méthode est utilisée en parallèle de la mesure turbidimétrique pour obtenir une corrélation DO/concentration en biomasse (Poids-sec) afin d'éviter le recours systématique à cette technique longue et peu précise dans les faibles valeurs de biomasse.

Les courbes de proportionnalité DO/Poids sec pour la souche *B. bruxellensis* (distillerie-B5d) et *B. bruxellensis* (vin-B2) cultivées sur milieu minimum à 30°C sont présentées ci-dessous sur la **figure 2.5** et **2.6**:

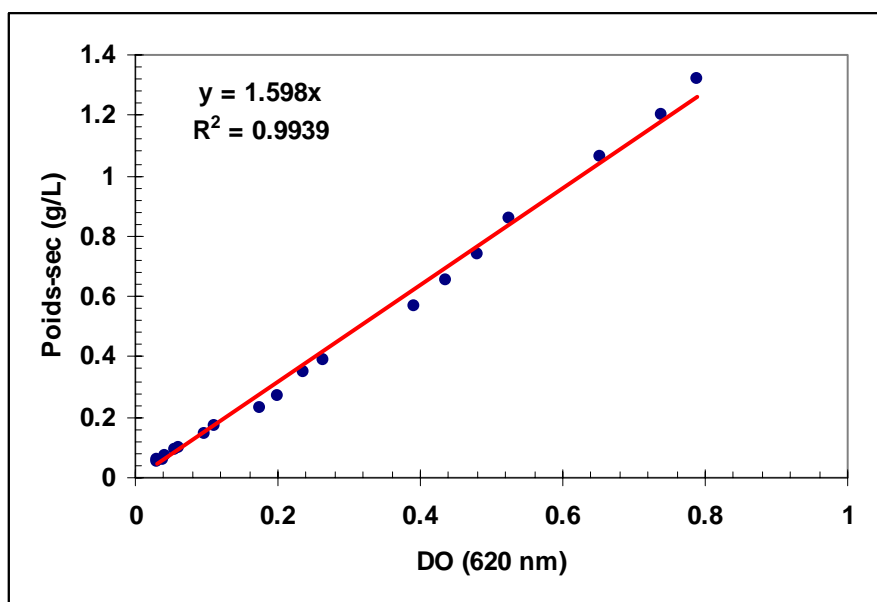


Figure 2.5. Corrélation entre le poids-sec et la densité optique à 620 nm pour *B. bruxellensis* isolés de la distillerie (B5d).

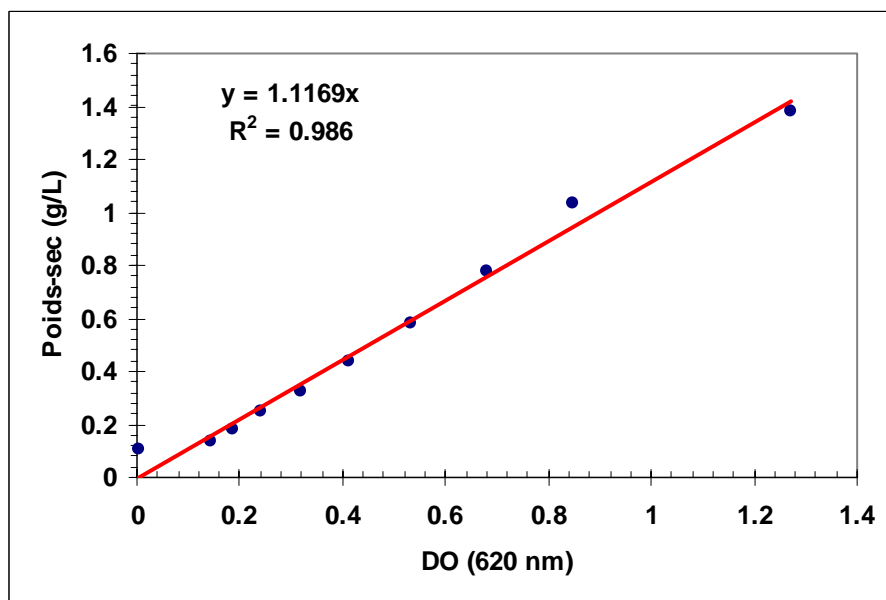


Figure 2.6. Corrélation entre le poids-sec et la densité optique à 620 nm pour *B. bruxellensis* vin (B2).

2.4.1.3 Numération cellulaire

Cette méthode est fondamentale pour une approche quantitative et qualitative de la population au cours de la fermentation. La numération s'effectue en utilisant une cellule de Thoma sous un microscope Olympus® BH-2 avec un grossissement 40 X 10. Chaque comptage dans la cellule de Thoma est réalisé à partir de 5 grands carreaux: les carreaux des extrémités et un carreau central (**Figure 2.7**). Cette cellule est constituée par 16 grands carreaux, chacun subdivisé en 16 petits carreaux. Il faut compter au moins 150 cellules par lame pour obtenir une erreur inférieure à 10% (Lange et coll., 1993). La concentration en cellules (X) par mL de milieu est donnée par la relation:

$$X = \frac{Nd}{4n10^{-6}} \quad (2.1)$$

Où:

N= nombre de levures comptées

d= facteur de dilution

n= nombre de grands carreaux

Pour les numérations effectuées pour des milieux peu concentrés en microorganismes ou au début de la fermentation, il est indispensable de compter sur l'intégralité du quadrillage de la lame (16 grands carreaux).

La méthode de comptage doit être rigoureuse pour obtenir des résultats reproductibles. Certaines règles sont ainsi fixées: une levure sera considérée comme 2 individus distincts lorsque la cellule fille aura atteint la moitié de la taille de la cellule mère.

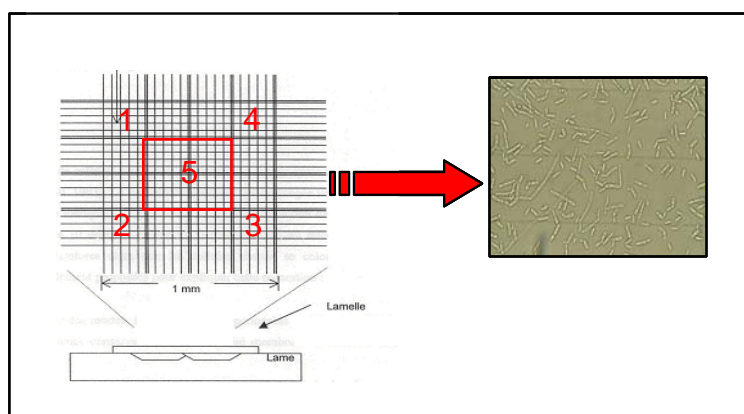


Figure 2.7. Schéma de la cellule de THOMA.

2.4.1.4 Pourcentage de viabilité

Le pourcentage de cellules viables est estimé par comptage après coloration au bleu de méthylène (Lange et coll. 1993). La suspension cellulaire est mélangée volume à volume avec une solution de bleu de méthylène (0,1 g de bleu de méthylène par litre de tri-citrate de sodium dihydraté à 2% poids/vol). Après 10 minutes de contact, l'observation au microscope montre les cellules viables incolores alors que les cellules mortes apparaissent en bleu. L'erreur relative sur le comptage que nous avons obtenue est inférieure à 10% entre trois comptages consécutifs.

Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la coloration de levures avec le bleu de méthylène:

- 1) Ce colorant d'oxydoréduction, est réduit par une hydrogénase intracellulaire et devient incolore (forme réduite) si la cellule est vivante (Postgate, 1967).
- 2) La membrane des levures mortes, fragilisée, devient perméable au bleu de méthylène alors que les cellules vivantes conservent une perméabilité membranaire sélective qui interdit la pénétration du colorant (Bonora et Mares, 1982).

Cette méthode permet de fixer avec précision le taux d'inoculation et de suivre l'état physiologique des levures au cours de la fermentation.

Le pourcentage de viabilité (% V) est donc calculé comme suit:

$$\% V = \frac{N_v}{N_t} \times 100 \quad (2.2)$$

Où:

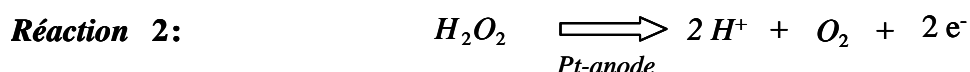
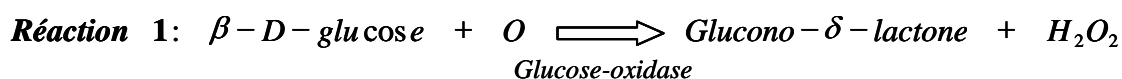
N_v = nombre de levures viables

N_t = nombre de levures totales

2.4.2 Analyse des sucres

2.4.2.1 Dosage par méthode enzymatique (YSI)

Nous avons utilisé l'YSI (Yellow Spring Instrument) pour mesurer la concentration du glucose. L'YSI est un appareil qui utilise une enzyme immobilisée (glucose-oxydase) sur une membrane, elle-même couplée à une sonde électrochimique. L'enzyme réagit avec le glucose et produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , réaction 1). Celui-ci est ensuite électrochimiquement oxydé par une anode de platine, cette réaction produit un signal électrique proportionnel à la concentration en glucose de la solution dosée (réaction 2).



2.4.2.2 Dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Le glucose et le fructose ont été analysés par HPLC, après filtration de l'échantillon sur une membrane au seuil de coupure de 0,45 μ m. Le chromatographe utilisé est équipé d'un injecteur automatique TSP Spectra Système Autosampler AS100 et d'un détecteur réfractométrique différentiel SpectraPhysics RefractoMonitor IV SP8430.

La séparation a été faite par exclusion d'ions sur colonne de résine cationique Bio-Rad Aminex HPX-87H spécifique pour la séparation des alcools, acides organiques et sucres. La colonne est thermostatée à 40°C, la phase mobile est une solution d'acide sulfurique 0,005M circulant avec un débit de 0,4 mL/min. Les surfaces des pics ont été traitées par un ordinateur équipé du logiciel PC100. Cette surface est corrélée à une valeur en concentration par l'intermédiaire d'une courbe de calibration (15 g/L maximum).

Ainsi, le dosage du glucose a été réalisé, selon les cas par l'une ou l'autre des 2 méthodes: méthode enzymatique ou HPLC. Nous avons vérifié que le choix de la méthode n'influe pas sur le résultat. La **figure 2.8** montre la comparaison entre les deux techniques utilisées. On peut voir qu'il y a une bonne corrélation entre les deux méthodes proposées, puisque nous avons trouvé les mêmes profils de consommation de glucose. Donc, quelle que soit la technique mise en place, nous obtiendrons les mêmes résultats.

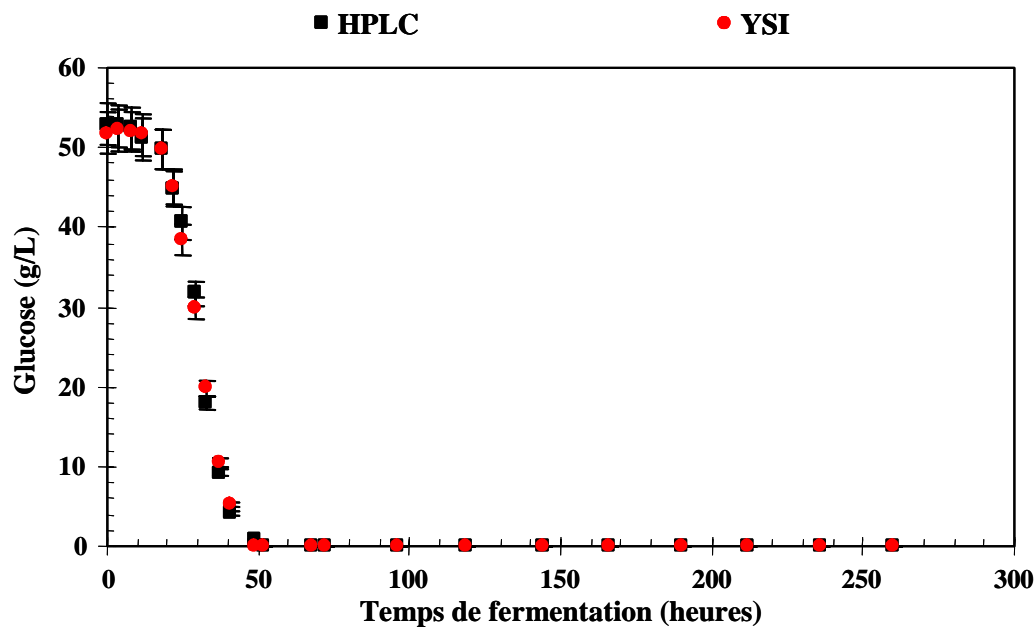


Figure 2.8. Comparaison entre deux méthodes pour doser le glucose (HPLC et YSI)

2.4.3 Analyse de l'éthanol

L'analyse s'effectue dans les mêmes conditions que pour la détermination des sucres en HPLC (dosage simultané sur le même échantillon).

2.4.4 Analyse de l'acide acétique

L'acide acétique a été détecté de la même façon que pour les autres constituants du milieu de fermentation (sucres et éthanol en HPLC).

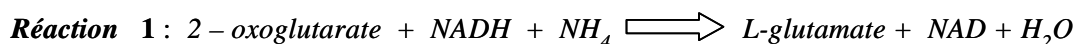
2.4.5 Dosage du glycérol

Le glycérol est détecté par chromatographie liquide de haute pression (HPLC) dans les mêmes conditions que les sucres, l'alcool et l'acide acétique.

2.4.6 Dosage de l'azote par méthode enzymatique

Les dosages de l'azote ammoniacal et de l'azote alpha-aminé ont été effectués en utilisant un automate MASCOTT PLUS. Le protocole utilisé pour le dosage de l'azote ammoniacal et d'azote alpha-aminé est proposé en kit par MICRODOM (kit de référence 110 05 037 00 et 110 10 110 00, respectivement). Les principes analytiques sont les suivants :

- **Dosage de l'azote NH_4 :** L'azote ammoniacal réagit avec l'oxoglutarate et le nicotinamide-adenine-dinucléotide réduit (NADH) en présence de l'enzyme glutamato-déshydrogénase (GIDH) pour produire le NAD et L-glutamato (réaction 1).



- **Dosage de l'azote alpha aminé:** Le dosage d'azote alpha aminé se déroule en deux phases:
 - (1) La première phase consiste à marquer (fluorescence) tous les acides aminés primaires en utilisant le réactif OPA.
 - (2) Dans une deuxième phase, la densité optique (DO) à 335 nm est mesurée.

Ces deux protocoles sont détaillés dans les feuillets MICRODOM qui accompagnent le kit des réactifs (annexe 1). La concentration d'azote assimilable est calculée à partir de la formule suivante:

$$\text{Azote assimilable (mg/L)} = \text{azote ammoniacal} + \text{azote alpha-aminé}$$

2.4.7 Reproductibilité des méthodes utilisées

Nous avons déterminé la reproductibilité des méthodes utilisées dans ce travail. En réalisant trois fois la même expérience. On observe sur la **figure 2.9** que les trois expériences réalisées dans les mêmes conditions sont similaires. Nous avons obtenu un pourcentage d'erreur inférieur à 5%. Donc, nous avons une très bonne reproductibilité des expériences, ainsi, on peut valider les méthodes utilisées. Le **tableau II.1** présente le pourcentage d'erreur pour chaque méthode utilisée.

Nous avons calculé le pourcentage d'erreur à partir de la formule suivante:

$$\% \text{ erreur} = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100 \quad (2.3)$$

$$\text{Moyenne: } \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{écart type: } S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

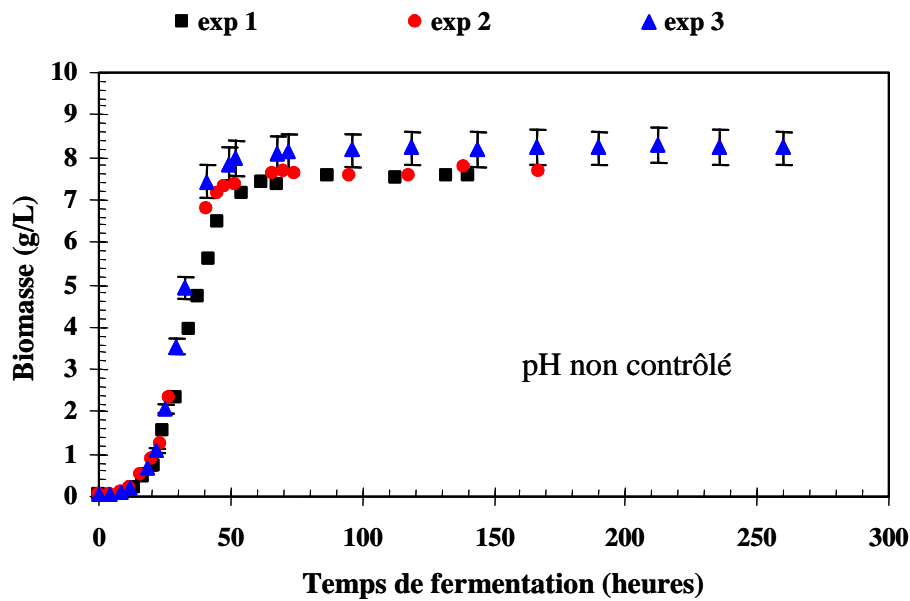


Figure 2.9. Reproductibilité des données expérimentales. Expériences à pH non régulé.

Tableau II.1. Pourcentage d'erreur pour chaque composé et différentes méthodes.

Composé	% erreur
Glucose	1,43
Fructose	1,39
Ethanol	1,93
Acide acétique	1,55
Glycérol	1,89
Azote-NH ₄	2,97
Azote - α aminé	1,95

2.5 Analyseur de gaz (CO₂ et O₂)

La détermination de dioxyde de carbone et d'oxygène est faite grâce à deux analyseurs placés en sortie du fermenteur (armoire analyseur des gaz, **figure 2.10**).

L'analyseur d'oxygène « SERVOMEX 4100 » exploite les propriétés paramagnétiques du gaz alors que l'analyseur de CO₂ « SERVOMEX 4100 » permet sa quantification grâce à l'absorption de radiations IR par la molécule. Ces appareils transmettent à l'ordinateur des tensions électriques proportionnelles à la composition du gaz en sortie du fermenteur.

Les appareils donnent la composition en pourcentage de CO₂ et d'O₂. L'analyse du gaz en sortie a été faite par la méthode des bilans gazeux qui repose sur la conservation du débit molaire en azote dans le courant gazeux traversant le fermenteur. En effet, ce gaz, qui est inerte et donc non utilisé par les micro-organismes, se retrouve intégralement dans le courant gazeux sortant (D_S) du fermenteur (**Figure 2.10**).

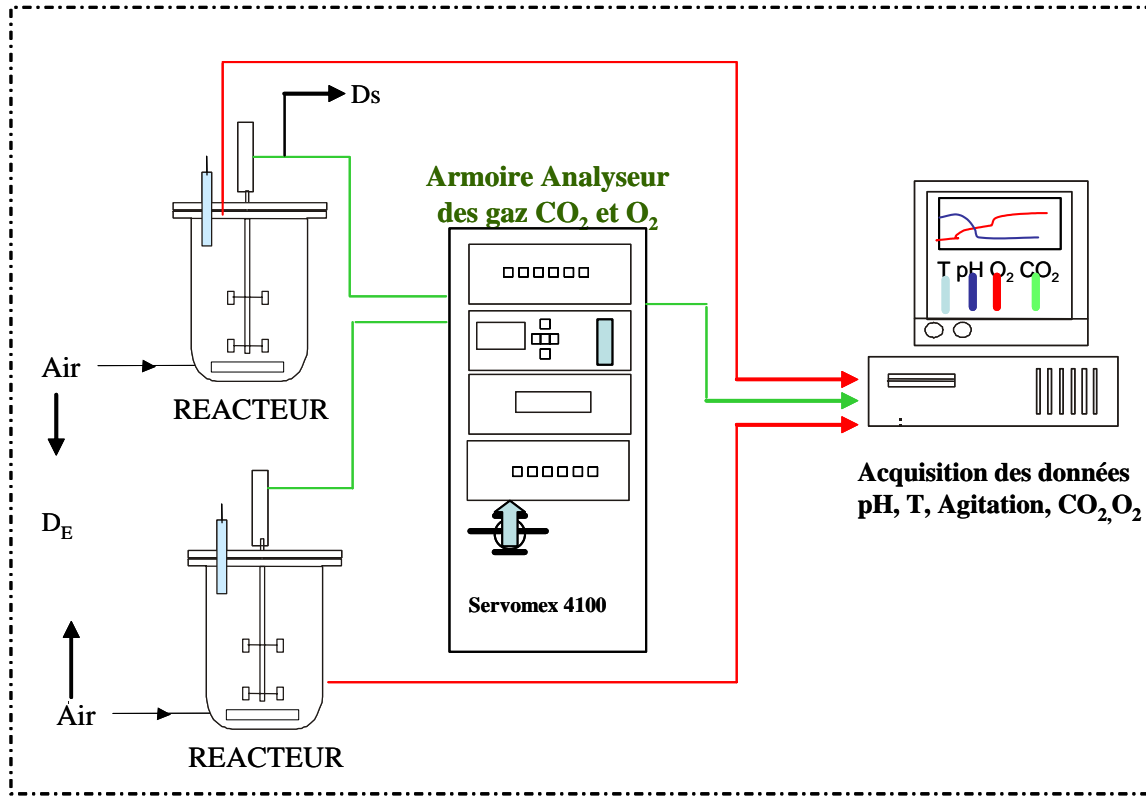


Figure 2.10. Schéma de dispositif expérimental pour la détermination des concentrations de dioxyde de carbone et d'oxygène.

2.6 Calcul des paramètres stoechiométriques et cinétiques

- Le rendement $Y_{X/S}$ (g biomasse/g sucre) en biomasse par rapport au sucre est défini comme :

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (2.4)$$

- Le rendement $Y_{P/S}$ (g produit / g sucre) en produit (éthanol) par rapport au sucre est défini comme :

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (2.5)$$

- La vitesse instantanée de production de biomasse est définie comme (r_x) :

$$r_x (g / L / h) = \frac{dX}{dt} \quad (2.6)$$

- La vitesse instantanée de consommation de substrat est définie comme (r_s) :

$$r_s (g / L / h) = \frac{dS}{dt} \quad (2.7)$$

- La vitesse instantanée de production de produit est définie comme (r_p) :

$$r_p (g / L / h) = \frac{dP}{dt} \quad (2.8)$$

- La vitesse spécifique de croissance est définie comme (μ):

$$\mu(h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.9)$$

2.7 Lissage des données expérimentales

Les valeurs expérimentales à partir des différentes analyses ont été collectées sur Microsoft Excel 7.0. Nous avons utilisé une macro de fonctions splines cubiques $g(t)$ vérifiant pour chaque couple de points expérimentaux (t_i, x_i) les conditions :

$$\int_{t_0}^{t_n} g''(t)^2 dt \text{ minimum et } \sum_{i=0}^{i=n} \left(\frac{g(t_i) - x_i}{\sigma(x_i)} \right)^2 \leq S \quad (2.10)$$

x_i : valeur expérimentale de la variable x au temps t_i

t_i : temps de prise de l'échantillon, compté à partir de l'ensemencement

$\sigma(x_i)$: écart-type lié aux valeurs expérimentales de x

n : nombre total de points expérimentaux

S : constante de lissage

Il y a deux conditions: la première a pour objectif de minimiser la dérivée seconde $g''(t)$ des fonctions de lissage $g(t)$, ce qui linéarise les jonctions des courbes les unes aux autres, générant ainsi des fonctions lisses. La deuxième condition exerce une contrainte sur ce lissage. En effet, la somme des carrés des écarts entre les points expérimentaux et les points du lissage ne dépasse pas la constante « S » que détermine le degré de liberté du lissage.

Le programme permet à l'utilisateur de choisir cette constante de lissage à partir de quelques règles:

⇒ L'allure de la courbe $g'(t)$ doit être physiquement significative.

⇒ La courbe $g(t)$ générée par un choix de la constante « S » ne doit pas dépasser graphiquement les barres d'erreur sur les points expérimentaux.

⇒ La valeur de la constante « S » doit être minimisée, tout en vérifiant les deux conditions précédentes.

Les données lissées ont permis de déterminer le taux spécifique de croissance « μ », dans la mesure où la concentration en biomasse (X) est associée à la fonction $g(t)$:

$$\mu = \frac{1}{X_i} \left(\frac{dX}{dt} \right)_i \quad (2.11)$$

2.8 Plan d'expériences

Pour évaluer l'effet des paramètres environnementaux sur la croissance de *Brettanomyces*, nous avons appliqué un plan d'expériences.

- **Codage des valeurs**

Pour simplifier la réalisation de ce plan, nous avons normalisé les facteurs impliqués dans le modèle.

La façon de normaliser les facteurs est définie par l'équation suivante:

$$X_i = \frac{(V_i - p)}{b} \quad (2.12)$$

Où:

X_i est la variable à normaliser

V_i est la valeur de la variable originale

p est la moyenne de la variable originale

b est la distance entre la moyenne de la variable originale et une de ces limites

Le traitement des données du plan d'expériences a été effectué par le biais du logiciel STATGRAPHICS CENTURION XV. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant une analyse des variances et le test T de Student.

- **Analyse des variances**

La présente analyse a pour but de déterminer si les variables du modèle elles-mêmes ne sont pas contrôlées par un facteur résiduel insoupçonné. Si ce fait est avéré, les résidus et les réponses, après calcul par le modèle construit suivant l'hypothèse d'indépendance des variables, formeraient deux groupes homogènes. La comparaison de deux groupes peut se baser sur leur moyenne et leur variance, si leurs effectifs sont proches. Cependant si les points calculés avec le modèle ont une variance équivalente à la somme de la variance expérimentale pure et de la variance résiduelle globale, l'estimation de leur moyenne dépend de cette variance. La méthode ANOVA consiste à relier ces deux paramètres : au lieu de calculer une variance pour chaque couple de points, on remplace l'ensemble par la *variance des écarts moyens* définie par

$$v_M = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^j \left[(Y_i)_{calcul} - \bar{Y}_c \right]^2}{(p-1)}} \quad (2.13)$$

Où, $\bar{Y}_c = \frac{1}{j} \sum_{i=1}^j (R_i)_{calcul}$ et (p-1) le degré de liberté égal au nombre de variables du modèle.

Pour tester si les résidus et les réponses calculées sont indépendants, on applique le test de Fisher. Soit $F = \frac{v_M^2}{e_r^2}$, on compare à la valeur critique de $F_c \{(p-1), (j-p), (\alpha = 0,05)\}$.

Dans le cas où $F > F_c$, l'indépendance des deux groupes est validée, au seuil de confiance de 5 %. Les variables sont donc indépendantes.

- **Test de Student**

En dernière partie, les variables du modèle sont classées suivant leur pertinence sur la réponse. Le test de Student permet de vérifier la signification statistique de chacune des variables indépendantes. Les valeurs de 't' du test sont les rapports des coefficients de la pente du polynôme sur leurs écarts-types. Si ce rapport est inférieur à une valeur critique de Student à (j-p) degrés de liberté et au seuil de confiance de 5 %, la variable considérée est alors estimée inutile pour la prédiction de la réponse. Le polynôme peut alors être simplifié.

Chapitre III:

Etude des Paramètres

Environnementaux sur la

Croissance de Brettanomyces

en Vinification

CHAPITRE 3. ETUDE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE DE *BRETTANOMYCES* EN VINIFICATION.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux effets de différents facteurs environnementaux sur la croissance de souches du genre *Brettanomyces*. Dans un premier temps, la sensibilité à l'éthanol de souches isolées de différents milieux sera testée. Cette première partie permettra de choisir une souche résistante à des conditions proches des milieux œnologiques et de tester ensuite, par la méthodologie des plans d'expériences, l'influence d'autres facteurs comme la température ou l'ajout de dioxyde de soufre.

3.1. Résistance des souches *Brettanomyces* à la concentration initiale en éthanol.

Cinq souches différentes ont été testées : quatre (nommés pour ces travaux TP1, B1, B2 et B4) ont été isolées de vins du sud de la France (Buzet et Madiran) et une souche a été isolée dans une industrie de production d'alcool (B5d). Les cultures pures ont été réalisées en erlenmeyer de 500 mL, contenant 300 mL de milieu synthétique « type vin » décrit dans la partie « matériel et méthodes ». Les teneurs en éthanol testées sont 6, 8, 9 et 10%. Les fermentations ont été conduites sans aération, sous une agitation de 150 tours/min et à une température de 30°C. Le taux d'ensemencement initial était de 3.10^6 cellules/mL.

La biomasse, la concentration en substrats (glucose et fructose), ainsi que les concentrations en acide acétique, glycérol et éthanol ont été suivies tout au long des fermentations. Les **figures 3.1, 3.2, 3.3, et 3.4** illustrent les résultats obtenus pour les 4 teneurs en éthanol et les 5 souches étudiées.

Au travers le suivi de ces expériences, d'une part les caractéristiques cinétiques générales de ces souches seront établies et d'autre part l'existence ou non d'une variabilité entre souches sera évalué. A l'issue de cette étude, une souche tolérante à l'éthanol sera choisie afin de tester pour celle-ci plusieurs paramètres environnementaux de la vinification.

La **figure 3.1** présente l'évolution de la population totale de *Brettanomyces* pour chaque fermentation réalisée en fonction du temps. Ces cinétiques ont des profils classiques de

croissance de levures, quelles que soient les souches et les concentrations en éthanol : phase de démarrage (pas de latence), phase d'accélération, phase de ralentissement puis phase stationnaire. Des différences de vitesses sont toutefois observées entre les souches pour une même concentration en éthanol. La souche TP1 est à chaque fois la souche la plus lente alors que la souche B5d est la plus rapide (tableau 3.I).

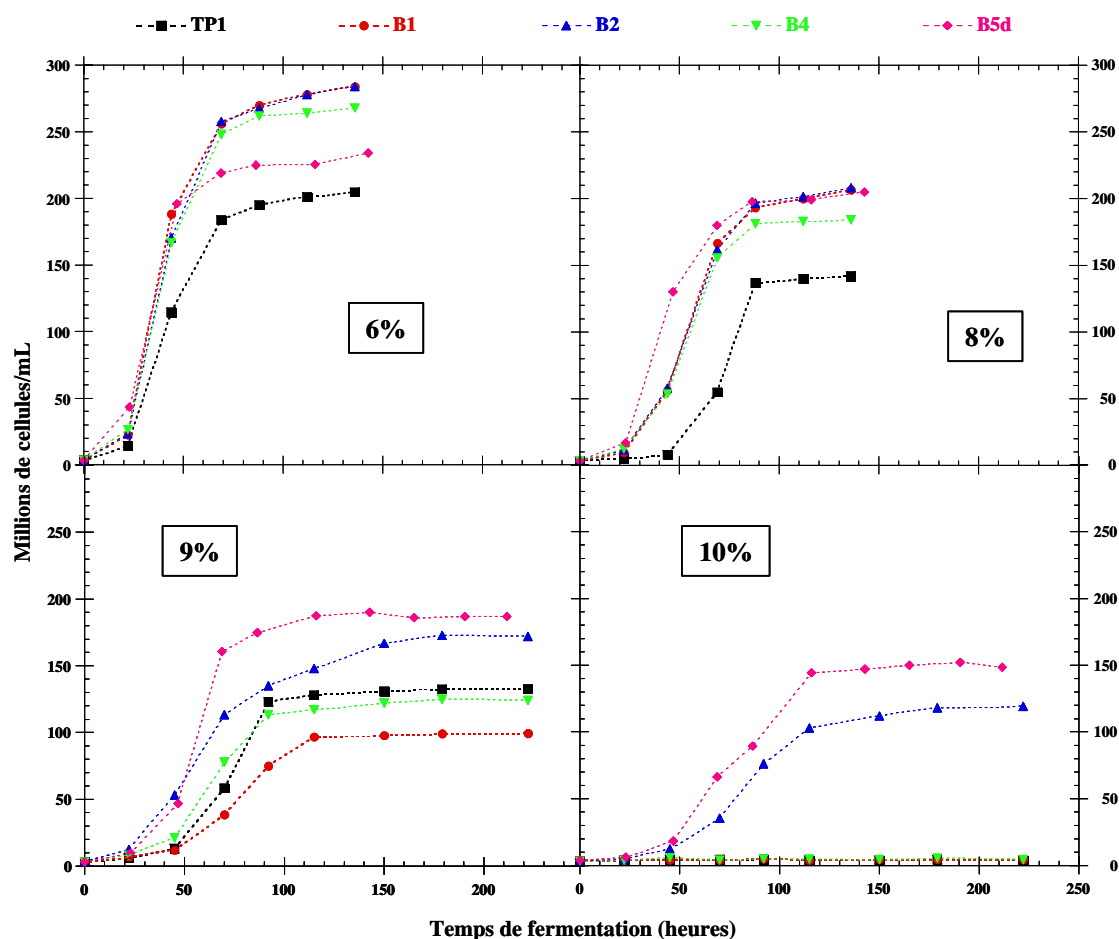


Figure 3.1. Profil cinétique de croissance à différents teneurs en éthanol en 5 souches de *Brettanomyces*.

L'influence de l'éthanol est globalement la même pour toutes les souches. Lorsque l'on passe de 6% à 10% de teneur en éthanol, les populations maximales obtenues en phase stationnaire diminuent, les vitesses spécifiques maximales diminuent également et les durées de fermentation augmentent. Ces effets sont cependant plus ou moins marqués selon les souches. Les souches B2 et B5d sont les moins sensibles à l'éthanol puisque même à 10% d'éthanol la population finale est encore significative (120 et 150 millions de cellules/ml). Par contre, les 3 autres souches sont totalement inhibées à 10%

d'éthanol et aucune croissance n'est observée en 220 heures (**figure 3.2**). Il existe donc une certaine variabilité entre les souches puisque elles ont une sensibilité plus ou moins prononcée à la teneur en éthanol.

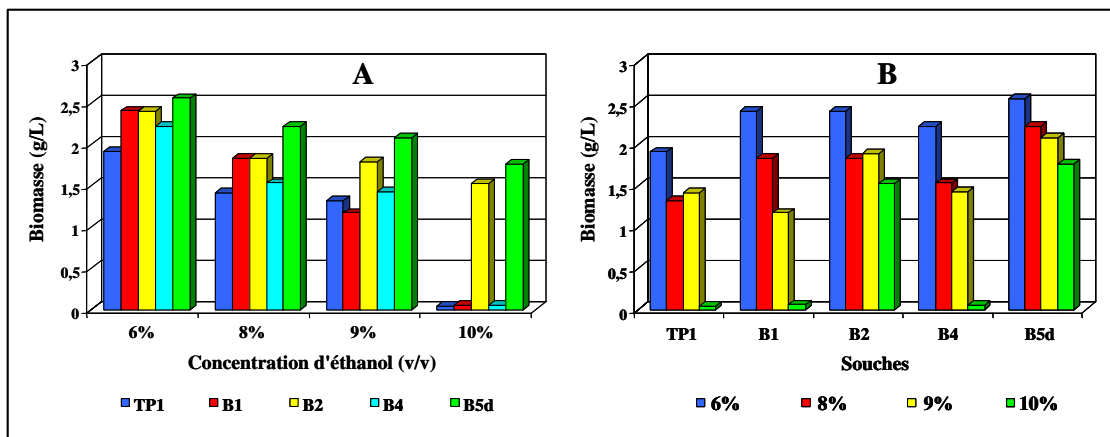


Figure 3.2. Comparaison de la concentration de biomasse maximale en fonction de différentes teneurs en éthanol pour 5 souches de *Brettanomyces* (A) et en fonction de différentes souches pour 4 teneurs en éthanol différentes (B).

Tableau III.1. Comparaison des vitesses spécifiques maximales de croissance pour les 5 souches à différentes concentrations en éthanol.

Souche	Concentration d'éthanol (v/v)			
	6%	8%	9%	10%
TP1	0.082	0.048	0.057	-
B1	0.093	0.069	0.050	-
B2	0.093	0.068	0.070	0.046
B4	0.092	0.075	0.060	-
B5d	0.130	0.099	0.077	0.047

Le glucose et le fructose constituent les deux sources de carbone et d'énergie entrant dans la composition du milieu de culture. Ainsi, la **figure 3.3** montre les quantités résiduelles de glucose et de fructose en fin de fermentation pour chaque souche et chaque concentration d'éthanol testées.

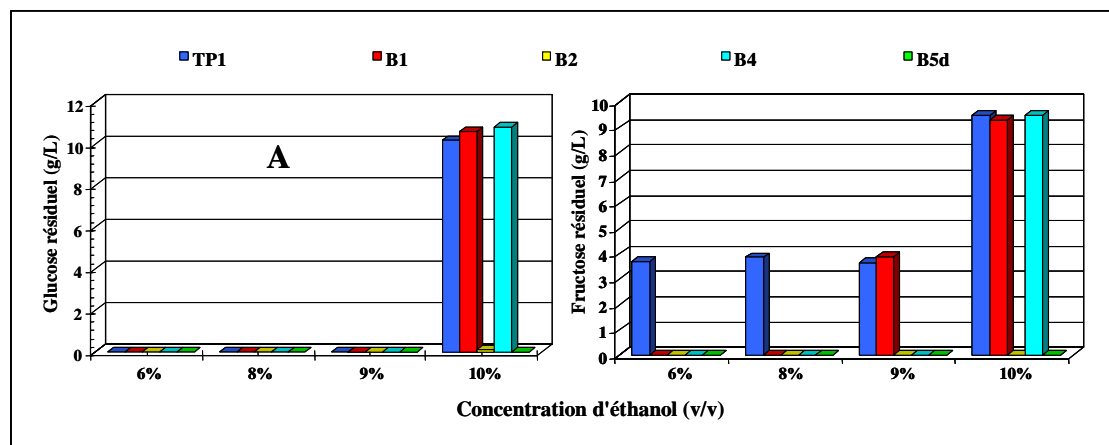


Figure 3.3. Concentration de glucose (A) et de fructose (B) résiduel à différentes teneurs en éthanol pour 5 souches de *Brettanomyces*.

Le glucose a été complètement consommé pour toutes les souches pour des concentrations en éthanol comprises entre 6 et 9%. A 10% d'éthanol également, tout le glucose a été consommé par les souches B2 et B5d. En revanche, pour les souches TP1, B1 et B4 pour lesquelles aucune croissance n'a été observée à cette concentration en éthanol, nous retrouvons la totalité du glucose initial en fin de fermentation (**Figure 3.3 A**).

En ce qui concerne le fructose, la **figure 3.3 B** montre que la souche TP1 n'assimile pas complètement ce sucre. Une concentration d'environ 3.7 g/L de fructose est présent en fin de fermentation pour les expériences à 6, 8 et 9% d'éthanol. Pour la souche B1 on observe que l'inhibition sur la consommation de fructose débute à partir de 9% d'éthanol. A 10% les souches TP1, B1 et B4 sont totalement inhibées et, comme pour le glucose, elles ne consomment pas le fructose. Les souches B2 et B5d, elles, consomment totalement le fructose quelle que soit la concentration en éthanol.

Nous avons donc une variabilité des ces 5 souches vis-à-vis de l'assimilation des sucres glucose et fructose.

La concentration en acide acétique est également affectée par la teneur en éthanol. Sa production diminue avec l'augmentation de la concentration en éthanol. Cependant, comme pour la croissance, on constate là encore des disparités quant à la sensibilité des souches à l'éthanol pour la production d'acide acétique (**Figure 3.4**). Par exemple à 6% d'éthanol, la souche TP1 est moins productrice d'acide acétique (1.38 g/L) suivie des

souches B2 (3.0 g/L) et B4 (3.4 g/L). Enfin, la souche B5d présente une production d'acide acétique plus importante (4 g/L).

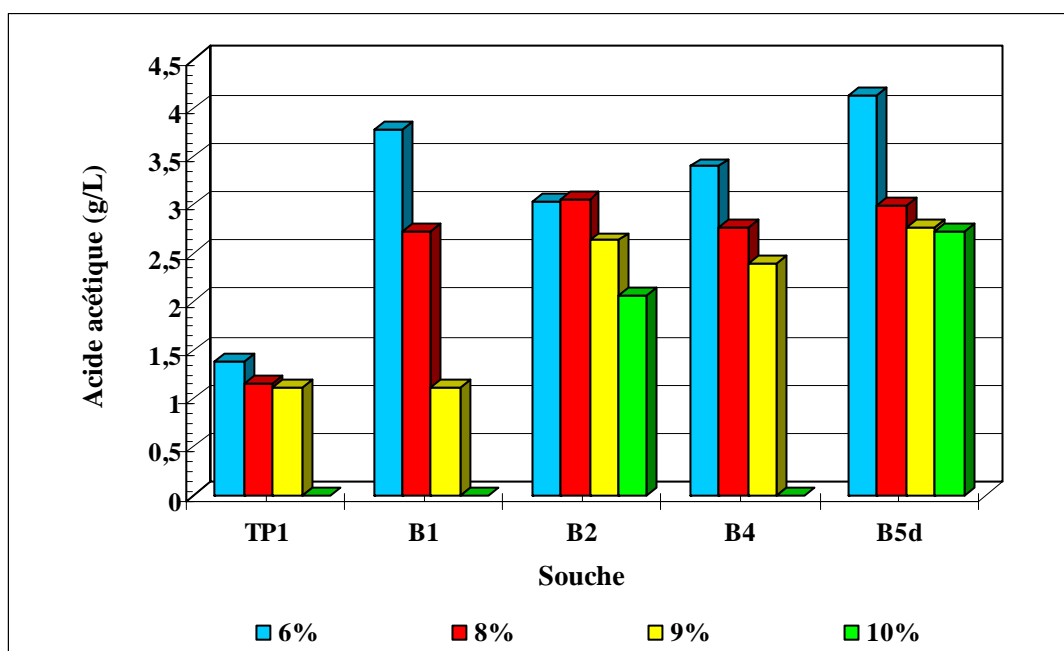


Figure 3.4. Comparaison des souches *Brettanomyces* pour la production d'acide acétique en fonction de la teneur en éthanol.

L'exploitation des résultats en ce qui concerne la production d'éthanol est délicate. En effet, les quantités initiales présentes dans le milieu varient entre 45 g/L et 75 g/L. Les quantités produites par *Brettanomyces* sont de l'ordre environ de 5 g/L soit 10% environ. Mais à 30°C, pendant 200 à 250h de fermentation, l'évaporation de l'éthanol n'est pas négligeable (ceci sera confirmé par la suite). Il en résulte une évolution des concentrations en éthanol difficile à interpréter car les variations dues à la production sont compensées par l'évaporation et au total les fluctuations sont de l'ordre de l'erreur expérimentale du dosage de l'éthanol. Nous n'avancerons donc pas de conclusions vis-à-vis de ce constituant.

En ce qui concerne le glycérol, aucune des souches testées ici ne le consomme ou ne le produit. Ce résultat est tout à fait comparable avec les résultats obtenus par Wijsman et coll., (1984) et Van Dijken et Scheffers (1986) qui n'ont pas trouvé de glycérol lors d'expériences avec *Brettanomyces intermedius*. De même, Aguilar (1998) montre que le glycérol ajouté en début de fermentation demeure constant. Les hypothèses possibles

émises pour l'absence de production de glycérol chez *Brettanomyces* sont liées à l'effet « Custer » (cité dans la bibliographie) et rapportés par Wijsman et coll., (1984) et Van Dijken et Scheffers (1986). Ils mentionnent qu'il est possible que l'enzyme glycérol-3-phosphatase soit inactive chez cette levure. De plus, il a été mis en évidence que chez ce genre de levure, la synthèse de l'acide acétique pourrait modifier l'équilibre redox, nécessaire à la production de glycérol provoquant ainsi l'incapacité de la cellule à le produire. La voie métabolique que constitue la fermentation glycéro-pyruvique est pratiquement inactive ou très peu active et la réoxydation du NADH_2 est effectuée rapidement par la réduction de l'acétaldéhyde (Wijsman et coll., 1984; Aguilar-Uscanga, 1998).

Il est intéressant d'observer pour les souches B5d et B2 par exemple que la même quantité de sucres est consommée (10g/L de glucose et 10 g/L de fructose) quelle que soit la concentration en éthanol. Pourtant les quantités de métabolites et de biomasse produites diminuent avec l'augmentation de la concentration en alcool. Ainsi entre 6% et 10% d'alcool, la biomasse passe de 2.4 g/L à 1.5 g/L pour B2, l'acide acétique de 3g/L à 2g/L et même si l'éthanol est difficilement quantifiable il semble qu'il n'y ait pas un gros écart entre les deux expériences. Cela signifie que globalement, en présence d'éthanol, les levures consomment autant de substrat pour faire moins de produits et de biomasse, ce qui signifie que pour boucler les bilans carbone, plus de CO_2 doit être dégagé. Une hypothèse pourrait être qu'en présence de fortes concentrations en éthanol, les levures sont stressées et ont des besoins énergétiques plus importants pour leur maintenance. Ceci serait bien sur à vérifier en effectuant des bilans carbone complets sur les fermentations (avec mesure du CO_2 et de l'éthanol).

Comme nous l'avons vu dans les figures précédentes (**figure 3.1, 3.2, 3.3 et 3.4**), la souche B2 présente la meilleure tolérance à l'éthanol (capable de se développer à des concentrations en éthanol de 10%). C'est pourquoi elle sera choisie pour réaliser l'étude suivante.

Pour conclure cette partie, la **figure 3.5** montre les profils cinétiques de biomasse, d'éthanol, de sucres (glucose et fructose), d'acide acétique et de glycérol pour la souche B2 à 10% d'éthanol.

La croissance de *Brettanomyces* est lente mais régulière. La biomasse finale est de 1,53 g/L, ce qui correspond à une concentration cellulaire de 119,2 millions de cellules/mL. Le rendement global sur la biomasse $Y_{X/S}$ est de 0,071 g de biomasse/g de sucre totaux. La croissance s'achève aux 150 heures de culture qui coïncide avec l'épuisement du substrat. Ainsi, nous n'avons pas observé de carence du milieu de culture sur la croissance de la levure.

La fermentation s'accompagne d'une production de 2,4 g/L d'acide acétique. Comme nous l'avons déjà expliqué, la quantité d'éthanol produite est difficile à quantifier. Cette figure donne une illustration des cinétiques classiques de fermentation par les levures *Brettanomyces* dans un milieu synthétique vin.

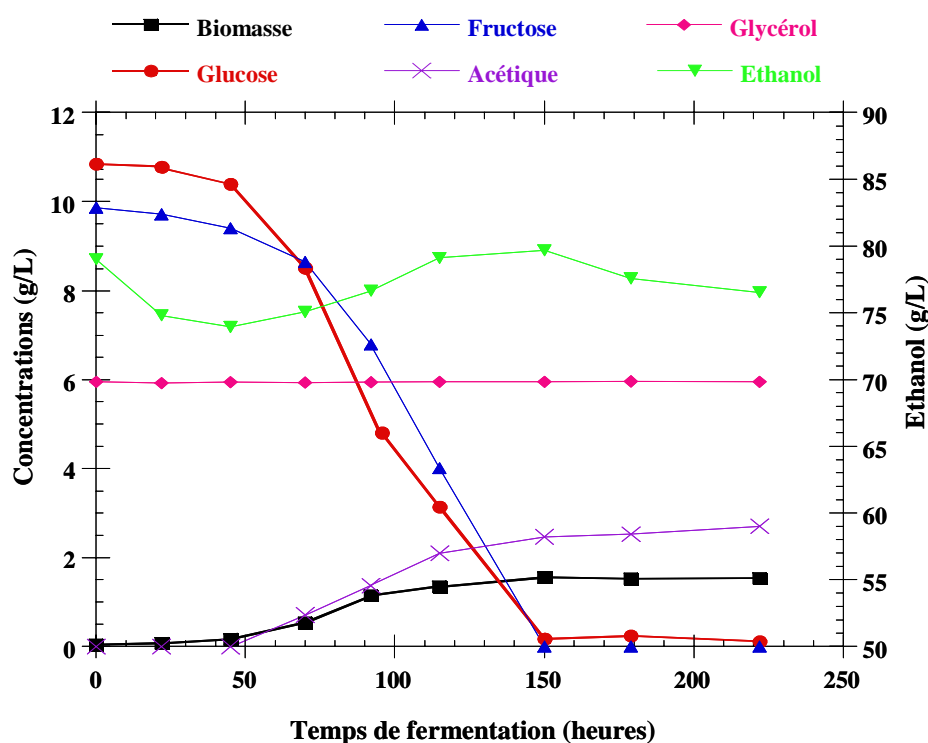


Figure 3.5. Evolution au cours de temps des concentrations en biomasse, en glucose, en fructose, en acide acétique et en glycérol pour *Brettanomyces* B2 dans un milieu synthétique vin à 10% d'éthanol (v/v).

Conclusions

- Les résultats précédents indiquent que l'augmentation de la concentration en éthanol a un effet négatif sur la croissance et l'activité fermentaire des souches testées. Plus la concentration en éthanol augmente, plus la croissance et la production des métabolites de fermentation diminuent.
- Ces résultats mettent également en évidence que, même si les tendances sont les mêmes pour toutes les souches, il existe une variabilité importante entre elles d'un point de vue cinétique. Toutes n'ont pas la même sensibilité à l'éthanol et dans nos conditions seules 2 sur les cinq testées se développent encore à 10% d'éthanol. De même, il existe des affinités différentes par rapport aux sucres entre les souches puisque deux d'entre elles ne semblent pas consommées totalement le fructose.
- Les souches B2 et B5d, les moins sensibles à l'éthanol seront retenues pour les études qui suivent. La souche B2 isolé d'un vin sera utilisée pour la partie qui suit où l'effet des paramètres environnementaux de vinification va être étudié au travers un plan d'expériences. Pour les chapitres 4 et 5, qui sont consacrées à une étude métabolique dans des conditions éloignées des vins, les souches B2 et B5d seront étudiées et comparées. Ils nous a en effet semblé intéressant de voir s'il existe des différences de comportements entre ces deux souches sachant que une a été isolée d'un vin (B2) et l'autre d'un milieu d'industrie alcoolique (B5d).

3.2. Effet de facteurs environnementaux de vinification sur la croissance d'une souche de *Brettanomyces* (B2).

Comme reporté dans la partie bibliographique, de nombreux facteurs environnementaux influent sur le développement de *Brettanomyces*. Néanmoins peu d'études font mention d'éventuelles interactions entre ces différents paramètres. Ainsi il est très difficile de conclure sur l'influence majoritaire d'un facteur par rapport à un autre. La problématique à ce niveau, qui correspond à une préoccupation industrielle, peut alors s'exprimer sous forme de trois questions.

- ⇒ Quels sont les facteurs environnementaux favorisant la croissance de ces levures contaminants lors des vinifications ?
- ⇒ Existent-t-il des interactions entre ces différents facteurs ?
- ⇒ Est-il possible de prédire l'apparition et le développement de *Brettanomyces*?

L'objectif de cette partie est de proposer des réponses à ces différentes questions. Pour cela, nous allons développer un plan d'expériences, méthode facile à mettre en œuvre permettant de tester rapidement plusieurs paramètres. Par cette méthode nous pourrions alors déterminer les facteurs prédominants et l'existence d'éventuelles interactions entre ces facteurs et ainsi répondre aux deux premières interrogations. Afin d'éviter que les résultats ne soient faussés, une étude préliminaire focalisée sur l'effet du pH a été menée. Ensuite, afin de répondre à la dernière question sur la possible prédiction du développement de *Brettanomyces*, nous avons développé un modèle dont nous présenterons les résultats en fin de chapitre.

3.2.1. Essais préliminaires

Nous avons tout d'abord réalisé des essais préliminaires afin de déterminer l'effet du pH en absence de SO₂. L'analyse bibliographique (paragraphe 1.6.3.) avait en effet souligné des interactions entre ces deux paramètres qui pourraient rendre difficile l'exploitation des résultats du plan d'expériences. Nous avons donc dans cette partie essayé de clarifier ce phénomène.

L'ensemble des expérimentations a été mené en erlenmeyers de 500 mL contenant 300 mL de milieu synthétique « type vin »,ensemencés à hauteur de $3 \cdot 10^6$ cellules/mL. La vitesse d'agitation a été fixée à 150 tours/min. En cours de culture, des prélèvements réguliers ont permis d'évaluer la cinétique de croissance de la biomasse. Les valeurs de pH testées ont été 3.2 et 3.6 dans un milieu avec concentrations croissantes en éthanol (7% et 10% v/v) et à deux températures fixes (18°C et 25°C).

La **figure 3.6** présente les résultats obtenus. Pour chaque condition testée, nous avons obtenu les mêmes profils de croissance pour un pH de 3.2 ou 3.6. Par exemple, lorsque les fermentations ont été réalisées pour une teneur en éthanol de 7% v/v et une

température de 25°C (**Figure 3.6 A**), les profils cinétiques ont été identiques. On observe une augmentation de la croissance dès le début de la fermentation, puis aux 100 h de culture la phase stationnaire est atteinte et reste constante jusqu'à la fin de la fermentation. La population finale obtenue a été autour de 210 millions de cellules/mL. Aucun effet du pH n'est donc observable dans ce cas.

Le même type de résultat est obtenu pour les essais dont les profils de croissance sont présentés sur la **figure 3.6 B** (18°C, 7% éthanol v/v). La concentration de biomasse finale et le temps de fermentation varient par rapport au premier essai mais aucun effet du pH sur la croissance n'est observable.

Au vu des résultats de ces expériences nous avons donc choisi de ne pas retenir le pH comme un facteur individuel dans la matrice du plan d'expériences.

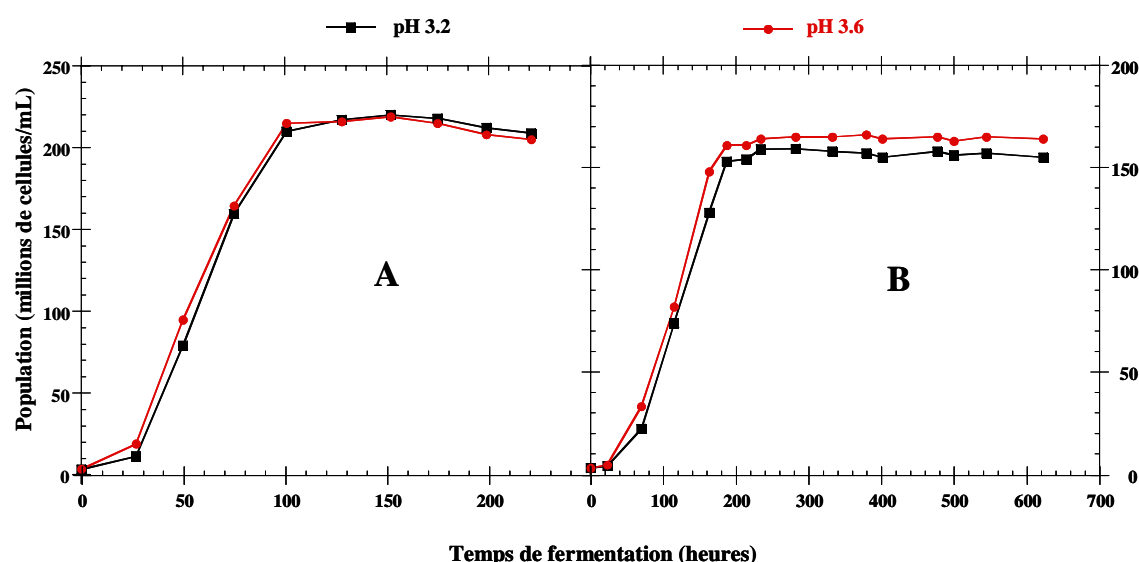


Figure 3.6. Effet du pH à différentes teneurs en éthanol et températures. (A) 25°C, 7% v/v d'éthanol, (B) 18°C, 7% v/v d'éthanol.

Néanmoins, il est bien connu que le pH joue un rôle très important sur l'action qu'exerce le dioxyde de soufre (SO_2) sur la croissance microbienne. Quand le SO_2 est ajouté dans un milieu, une quantité de celui-ci est combinée avec d'autres constituants du vin et une autre quantité reste libre dans la culture. Selon la valeur du pH, le SO_2 libre peut être dissocié et transformé en SO_2 moléculaire. Or, seulement le SO_2 moléculaire peut entrer dans la cellule et agir sur l'activité des micro-organismes. Ainsi, la quantité de SO_2 moléculaire disponible dans le milieu de culture est fonction du pH.

Une diminution du pH va augmenter la quantité de SO₂ moléculaire comme le montre l'équation 3.1 qui relie ces deux paramètres:

$$SO_2 \text{ moléculaire} = \frac{SO_2 \text{ libre}}{(10^{(pH-1.81)} + 1)} \quad (3.1)$$

D'après cette étude préliminaire, le pH n'apparaît donc pas comme un facteur directement influant. Il ne sera donc pas pris en considération comme facteur individuel pour l'analyse factorielle pour la suite du travail. Néanmoins, sa valeur permet de connaître et fixer la teneur en SO₂ moléculaire initial qui elle intervient comme facteur individuel du plan d'expériences.

3.2.2. Réalisation du plan d'expériences

Un plan d'expériences factoriel 2³ avec 4 points centraux (12 expériences au total) a été réalisé. La répétition du point central permet l'estimation de la variance expérimentale. L'ensemble de ces expériences va nous permettre de connaître l'impact de chaque variable d'étude sur la croissance de la levure ainsi que leurs éventuelles interactions. Les variables d'étude considérées sont la concentration initial en éthanol, la concentration initial en SO₂ moléculaire et la température. Les conditions opératoires testées sont :

- ⇒ Des concentrations en éthanol de 7, 8.5 et 10 % v/v.
- ⇒ Des concentrations en SO₂ moléculaire libre de 0.125, 0.16 et 0.39 mg/L.
Ces concentrations ont été calculées à l'aide de l'équation 3.1. Ainsi 0,125 mg/L correspond à 5mg/L de SO₂ total à un pH de 3.4, 0.16 à 10 mg/L de SO₂ total à un pH de 3.6 et 0.39 à 10 mg/L de SO₂ total à un pH de 3.4.
- ⇒ Des températures de 18°C et 25°C.

S'en suit une codification de ces variables d'étude suivant la méthode présentée dans le chapitre 2 section 2.9. A partir des variables d'étude, on peut donc déduire la matrice d'expériences suivante (**tableau III.2**):

Tableau III.2. Définition des différents niveaux des variables de la matrice d'expériences.

No. Expérience	Niveaux			Valeurs réelles		
	X1	X2	X3	Ethanol (X1)	SO ₂ m (X2)	Température (X3)
1	-1	1	1	7	0,39	25
2	-1	-0,74	1	7	0,16	25
3	1	1	1	10	0,39	25
4	1	-0,74	1	10	0,16	25
5	0	-1	1	8,5	0,125	25
6	0	-1	1	8,5	0,125	25
7	-1	1	-1	7	0,39	18
8	-1	-0,74	-1	7	0,16	18
9	1	1	-1	10	0,39	18
10	1	-0,74	-1	10	0,16	18
11	0	-1	-1	8,5	0,125	18
12	0	-1	-1	8,5	0,125	18

Nous avons choisi de suivre comme variables de réponse:

- ⇒ la concentration de biomasse maximale (X_{\max})
- ⇒ la vitesse de croissance maximale (μ_{\max}) et,
- ⇒ la phase de la latence (λ). Compte tenu de la diversité des définitions pour la phase de latence (cf. bibliographie), nous avons choisi de définir ce temps de latence comme le temps où on atteint une biomasse deux fois plus importante que la biomasse initiale (λ temps pour lequel $X=2X_0$).

D'autre part, un lissage des données expérimentales sur la biomasse a été réalisé pour éviter l'interférence des erreurs expérimentales (méthode utilisée paragraphe 2.10, section de matériels et méthodes). X_{\max} et μ_{\max} sont également obtenus à partir des données expérimentales lissées.

L'ensemble des vecteurs de réponse du plan d'expériences est regroupé dans le **tableau III.3.**

Tableau III.3. Présentation des différentes valeurs du temps de latence, μ_{\max} et X_{\max} pour chaque expérience.

No. Expérience	Variables d'étude			Variables de réponse		
	Ethanol (X1)	SO ₂ m (X2)	Température (X3)	Latence λ (heures)	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (g/L)
1	-1	1	1	16,73	0,068	2,18
2	-1	-0,74	1	25,22	0,063	2,18
3	1	1	1	307,74	0,035	1,76
4	1	-0,74	1	61,46	0,041	1,76
5	0	-1	1	25,57	0,052	1,97
6	0	-1	1	25,57	0,052	1,97
7	-1	1	-1	34,95	0,036	1,85
8	-1	-0,74	-1	28,69	0,031	1,85
9	1	1	-1	350,21	0,019	1,43
10	1	-0,74	-1	89,17	0,025	1,43
11	0	-1	-1	38,96	0,028	1,64
12	0	-1	-1	38,96	0,028	1,64

D'après le formalisme du plan d'expériences, les différentes valeurs des variables de réponse « y » ont été assimilées à un modèle polynomial du premier degré:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1X_2X_3 \pm \varepsilon \quad (3.2)$$

Le logiciel statistique STATGRAPHICS, CENTIRION XV a été employé pour analyser les résultats du modèle factoriel complet. La détermination des différents coefficients b_i du modèle polynomial (équation 3.2) s'est fait par une régression multilinéaire multi-variables. La méthode des moindres carrés est utilisée pour calculer le meilleur ajustement aux données. Afin de déterminer la sensibilité des paramètres calculés, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée dans chaque cas. D'autre part, le coefficient de régression R^2 représente le pourcentage d'explication des valeurs expérimentales par le modèle. Ainsi, il permet d'évaluer la validité du modèle polynomial.

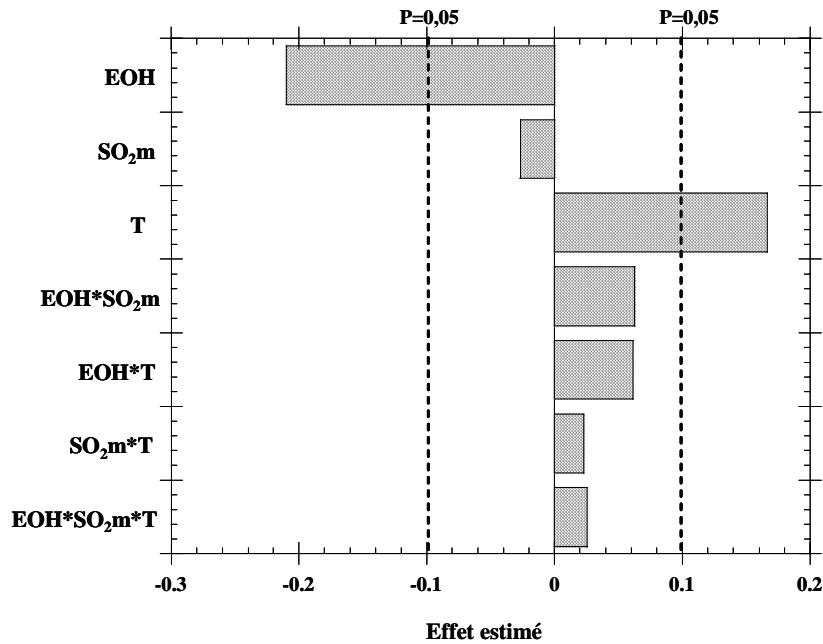
Les résultats de cette analyse sont présentés sur les **figures 3.7, 3.8 et 3.9** pour chaque variable de réponse. Ces figures regroupent un graphique de Pareto et son tableau de valeurs associées. Dans les tableaux nous pouvons relever les résultats de l'analyse de variance avec la valeur du test de Student (t) et conclure sur la sensibilité du paramètre évalué. Dans notre cas, pour un degré de liberté de 4 (obtenue à partir du traitement statistique), pour une probabilité supérieure à 95%, si la valeur absolue de t-student est supérieure à 2.77, le paramètre testé est considéré comme une variable significative. Cette valeur de t-student (2.77 à 4 degrés de liberté) est tirée des tables statistiques (Lacaze et coll., 1997). Le diagramme de Pareto représente visuellement les résultats du tableau puisqu'il permet de visualiser clairement l'influence de chacun des paramètres sur la variable de réponse.

- **Résultat sur biomasse maximale (X_{max})**

La **figure 3.7** présente les résultats obtenus pour l'importance des paramètres environnementaux sur la concentration de biomasse maximale atteinte en fin de fermentation. Comme on peut l'observer, la concentration en éthanol (EOH) et la température (T) ont un effet significatif tandis que le SO_2 moléculaire (SO_2 m) n'est pas significatif. Aucun facteur d'interaction n'est significatif. L'augmentation de la concentration en éthanol a un effet négatif sur la croissance de *Brettanomyces* tandis que l'augmentation de la température la favorise.

On peut alors décrire l'influence de ces différents facteurs par le polynôme :

$$X_{max} = 1.80 - 0.21 \text{ EOH} + 0.16 T \quad (3.3)$$



Coefficient	Valeur	Ecart-type	t-student	Sensibilité
b ₀	1,80	0,026	68,0	S
b ₁	-0,21	0,031	-6,64	S
b ₂	-0,026	0,029	-0,92	NS
b ₃	0,16	0,026	6,28	S
b ₄	0,062	0,036	1,74	NS
b ₅	0,062	0,031	1,95	NS
b ₆	0,022	0,029	0,79	NS
b ₇	0,025	0,036	0,71	NS

$R^2 = 0.96$

Figure 3.7 Effet des paramètres environnementaux sur la concentration de biomasse maximale (X_{max}).

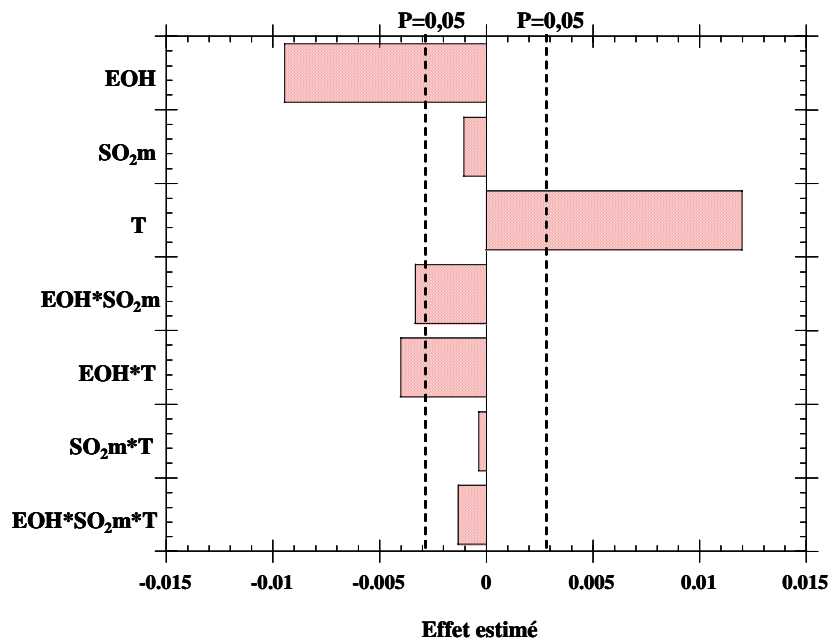
- **Résultat sur la vitesse de croissance maximale (μ_{max})**

La **figure 3.8** présente les résultats obtenus pour l'importance des paramètres environnementaux sur la vitesse de croissance maximale. Comme pour X_{max} la concentration en éthanol (EOH) et la température (T) ont un effet significatif (positif pour la température, négatif pour l'éthanol) tandis que le SO₂ moléculaire (SO₂ m) n'est pas significatif. Mais on observe également que les interactions de l'éthanol-température et SO₂-éthanol sont significatives ici contrairement à ce qui avait été observé pour la biomasse maximale. Cependant, ces interactions sont à la limite du seuil

de signification et ont donc un poids beaucoup moins important que la concentration en éthanol et la température.

On peut alors écrire l'influence de ces différents facteurs avec le polynôme :

$$\mu_{\max} = 0.039 - 0.009 \text{ EOH} + 0.011 \text{ T} - 0.003 \text{ EOH} \cdot \text{SO}_2\text{m} - 0.004 \text{ EOH} \cdot \text{T} \quad (3.4)$$

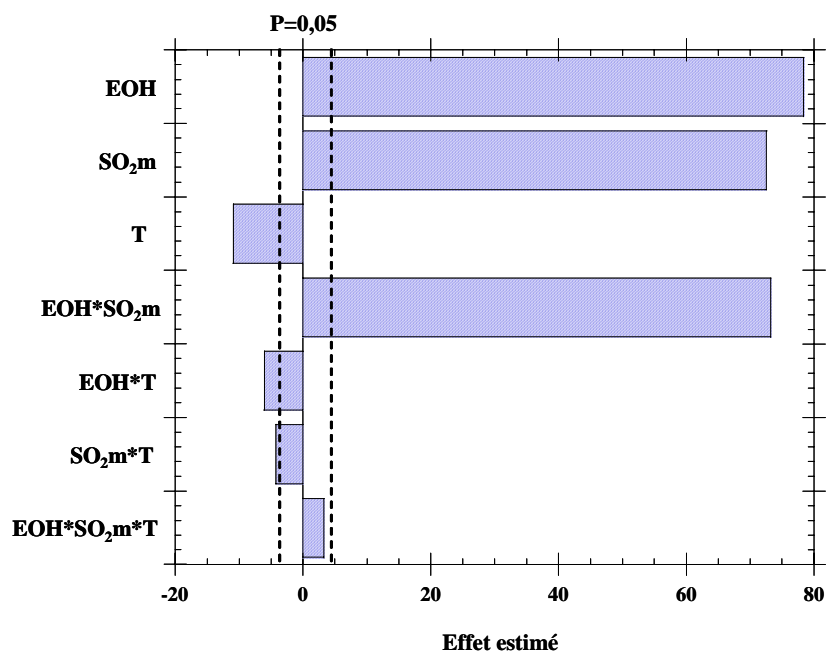


Coefficient	Valeur	Ecart-type	t-student	Sensibilité
b ₀	0,039	0,0008	49,25	S
b ₁	-0,009	0,0009	-9,84	S
b ₂	-0,001	0,0008	-1,20	NS
b ₃	0,012	0,0008	14,88	S
b ₄	-0,003	0,0011	-3,04	S
b ₅	-0,004	0,0009	-4,18	S
b ₆	-0,0003	0,0008	-0,40	NS
b ₇	-0,001	0,0011	-1,19	NS

$$R^2 = 0.99$$

Figure 3.8. Effet des paramètres environnementaux sur le taux spécifique maximal de croissance (μ_{\max}).

- **Résultat sur la phase de latence (λ)**



Coefficient	Valeur	Ecart-type	t-student	Sensibilité
bo	104.83	1.119	93,67	S
b1	78,35	1,33	58,68	S
b2	72,57	1,21	59,75	S
b3	-10,93	1,11	-9,76	S
b4	73,21	1,51	48,23	S
b5	-6,05	1,33	-4,53	S
b6	-4,24	1,21	-3,49	S
b7	3,28	1,51	2,16	NS

R²= 0.99

Figure 3.9. Effet des paramètres environnementaux sur la phase de latence (λ)

La **figure 3.9** montre que le temps de latence est principalement affecté par l'éthanol et la concentration de SO₂ moléculaire. Ces deux facteurs augmentent le temps de latence. L'interaction de l'éthanol et du SO₂ moléculaire est également très significative avec un effet synergique. De plus, nous avons observé un effet légèrement négatif pour la température. Les autres interactions sont toutes à la limite du test de t-student et même si elles sont statistiquement significatives leur poids par rapport aux variables seules est très faible.

On peut alors écrire l'influence de ces différents facteurs avec le polynôme :

$$\lambda = 104.8 + 78.3 \text{ EOH} + 72.5 \text{ SO}_2\text{m} - 10.9 \text{ T} + 73.2 \text{ EOH}.\text{SO}_2\text{m} - 6.0 \text{ EOH}.\text{T} - 4.2 \text{ SO}_2\text{m}.\text{T} \quad (3.5)$$

En ce qui concerne le pourcentage d'explication du modèle (R^2), on peut observer dans **les figures 3.7, 3.8 et 3.9** que nous avons obtenu de très bonnes valeurs de R^2 pour les différents modèles, entre 0.96 et 0.99. Ceci signifie que les modèles polynomiaux identifiés à partir du plan d'expériences permettent de bien prédire les valeurs des variables de réponses dans le domaine exploré.

Cette étude peut être comparée avec les travaux rapportés par Gerbaux et coll. (2000). Ils ont réalisé un plan d'expériences 2^3 pour montrer l'effet des paramètres environnementaux sur le développement de *Brettanomyces*. Les expériences ont été réalisées en vin de Pinot Noir,ensemencé avec une concentration de 4×10^3 CFU/mL. La souche utilisée a été *Brettanomyces* (23B4) isolée du vin de Pinot Noir. Les conditions opératoires testées sont:

- ⇒ Valeurs du pH: 3.4 et 3.8
- ⇒ Des concentrations en éthanol: 12 et 14 % v/v.
- ⇒ Des températures: 13°C et 18°C.

Les variables de réponse ont été: la vitesse de croissance et la population maximale. Ils ont mis en évidence que le développement d'une population de *Brettanomyces* est favorisé par un degré alcoolique faible et une température élevée (facteurs significatifs). Le niveau de pH présente un effet limité.

Des expériences parallèles menées par ces auteurs ont montré que des additions de SO_2 (20 et 40 mg/L) influent sur la population de *Brettanomyces*. Une concentration de 20 mg/L de SO_2 allonge la phase de latence mais n'a aucun effet sur la population. Pour une dose de 40 mg/L, la croissance est complètement inhibée pendant toute la culture. Ils ont en outre observé que l'efficacité du SO_2 est décroissante au cours du temps. Ainsi, cette inhibition doit être considérée comme temporaire et peut donc correspondre à un temps de latence.

L'ensemble de ces résultats (plan d'expériences et effet du SO₂) est en accord avec ceux obtenus dans ce travail. Le **tableau comparatif III.4** illustre ces similitudes. Même si nous avons travaillé dans des conditions différentes (souche, milieu de culture, pH, température, éthanol....) le même type d'effet a été obtenu pour chaque facteur étudié.

Tableau III.4. Comparaison des effets des facteurs environnementaux sur le développement de *Brettanomyces*. Gerbaux et coll. (2000) et Castro (2007).

Réponse	X _{max}		μ _{max}		λ	
	Gerbaux	Castro	Gerbaux	Castro	Gerbaux	Castro
pH	Effet limité	NS	Effet limité	NS		
Ethanol	S (-)	S (-)	S (-)	S (-)		S (+)
SO ₂	NS	NS		NS	S (+)	S (+)
Température	S (+)	S (+)	S (+)	S (+)		S (-)

S= significatif NS= non significatif (+) = favorise (-) = diminue

Par rapport à la connaissance du métabolisme des levures il est possible de donner quelques explications physiologiques sur les effets observés.

L'effet de l'éthanol sur la synthèse de biomasse peut être expliqué par la consommation de substrat pour l'énergie de maintenance. Lorsqu'il y a une concentration critique d'éthanol, le stress de la cellule augmente globalement les pertes d'énergie observables directement par une diminution de quantité de biomasse formée. Ainsi, l'influence négative de l'éthanol sur le développement des micro-organismes peut être liée à l'augmentation de l'énergie de maintenance. Cette énergie est dépensée pour assurer les fonctions de motilité, les régulations ATPasiques pour le maintien du potentiel transmembranaire, les flux de relargage d'excès de substrat (Thierie, 2000).

D'autre part, des études précédentes (paragraphe 1.6.1) ont rapporté que l'action inhibitrice de l'éthanol pouvait être liée à la perméabilité de la membrane des cellules modifiant la solubilité en lipides de la membrane (Leao et Van Uden, 1982). L'éthanol peut également empêcher l'action de l'hexokinase et de quelques enzymes impliquées

dans la synthèse des acides aminés. Des insuffisances métaboliques sur la reproduction peuvent alors être constatées (Nagodawithana et coll., 1977).

Des études rapportées dans l'étude bibliographique sur l'effet de la température ont montré qu'une augmentation de ce paramètre favorise la croissance des micro-organismes par l'augmentation de la fluidité de membrane et donc l'augmentation du système de transport des protéines (Nedwell 1999).

Pour l'effet du dioxyde de soufre, quelques auteurs mentionnent que cet additif peut réagir dans la cellule avec des protéines, des acides nucléiques et quelques cofacteurs. Ainsi, il peut inhiber les enzymes impliquées dans le métabolisme de la levure et comme conséquence les cellules ne peuvent pas se reproduire (Romano et coll., 1993).

3.2.3. Application d'un modèle mathématique pour la croissance de *Brettanomyces*.

Nous venons de déterminer les facteurs prédominants et souligner leurs éventuelles interactions grâce à l'application du plan d'expériences. Reste maintenant à trouver le moyen de prédire la croissance et le développement de *Brettanomyces*.

Pour cela, nous avons appliqué le modèle Logistique qui est un modèle largement répandu pour décrire la croissance de nombreux micro-organismes. La forme générale de l'équation logistique pour décrire la croissance est :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left[1 - \frac{X}{X_{\max}} \right] \quad (3.6)$$

L'intégration de l'équation 3.6 donne l'équation 3.7

$$X(t) = \frac{X_o e^{\mu_{\max} t}}{1 - \left(\frac{X_o}{X_{\max}} \right) (1 - e^{\mu_{\max} t})} \quad (3.7)$$

Pour pouvoir prédire la croissance de *Brettanomyces* on doit donc connaître les paramètres X_{\max} et μ_{\max} . D'autre part il est important de noter que ce modèle n'intègre pas le temps de latence.

Or avec le modèle factoriel, nous avons trois polynômes pour déterminer λ , μ_{\max} et X_{\max} en fonction de la concentration initiale en éthanol, en SO_2 moléculaire et de la température.

Ainsi, en combinant les polynômes du plan d'expériences et la loi Logistique nous pouvons modéliser le développement de *Brettanomyces*. La valeur de la phase de latence est simplement calculée à l'aide du polynôme représenté par l'équation 3.5. La phase de croissance est ensuite modélisée à partir de ce point par la loi Logistique. Les valeurs de X_{\max} et μ_{\max} nécessaires pour la représentation de ce modèle sont déterminées à partir des polynômes obtenus (équation 3.3 et 3.4 respectivement). Le modèle complet s'écrit donc :

$$\text{Pour } 0 < t < \lambda : \quad X(t) = X_o \left(\frac{t}{\lambda} + 1 \right)$$

$$\text{Pour } \lambda < t : \quad X(t) = \frac{X_o e^{\mu_{\max} t}}{1 - \left(\frac{X_o}{X_{\max}} \right) (1 - e^{\mu_{\max} t})}$$

Avec :

$$\lambda = 104.8 + 78.3 \text{ EOH} + 72.5 \text{ SO}_2\text{m} - 10.9 \text{ T} + 73.2 \text{ EOH} \cdot \text{SO}_2\text{m} - 6.0 \text{ EOH} \cdot \text{T} - 4.2 \text{ SO}_2\text{m} \cdot \text{T}$$

$$\mu_{\max} = 0.039 - 0.009 \text{ EOH} + 0.011 \text{ T} - 0.003 \text{ EOH} \cdot \text{SO}_2\text{m} - 0.004 \text{ EOH} \cdot \text{T}$$

$$X_{\max} = 1.80 - 0.21 \text{ EOH} + 0.16 \text{ T}$$

Les paramètres EOH, T et SO_2m sont en valeurs codées dans ces polynômes (entre -1 et 1).

Des exemples de comparaison données expérimentales / valeurs prédites par le modèle sont présentés sur les figures 3.10 A, B, C. La figure 3.10 A représente l'évolution de *Brettanomyces* en fonction de la température, la figure 3.10 B son évolution en fonction de la concentration en éthanol et la figure 3.10 C selon la concentration en SO_2 .

Dans tous les cas une bonne corrélation entre les points expérimentaux et les valeurs modélisées a été observée ($R^2 > 0.95$).

Il est donc possible de prédire avec une bonne précision le développement de *Brettanomyces* en utilisant un modèle de loi Logistique combiné à une analyse factorielle par plan d'expériences.

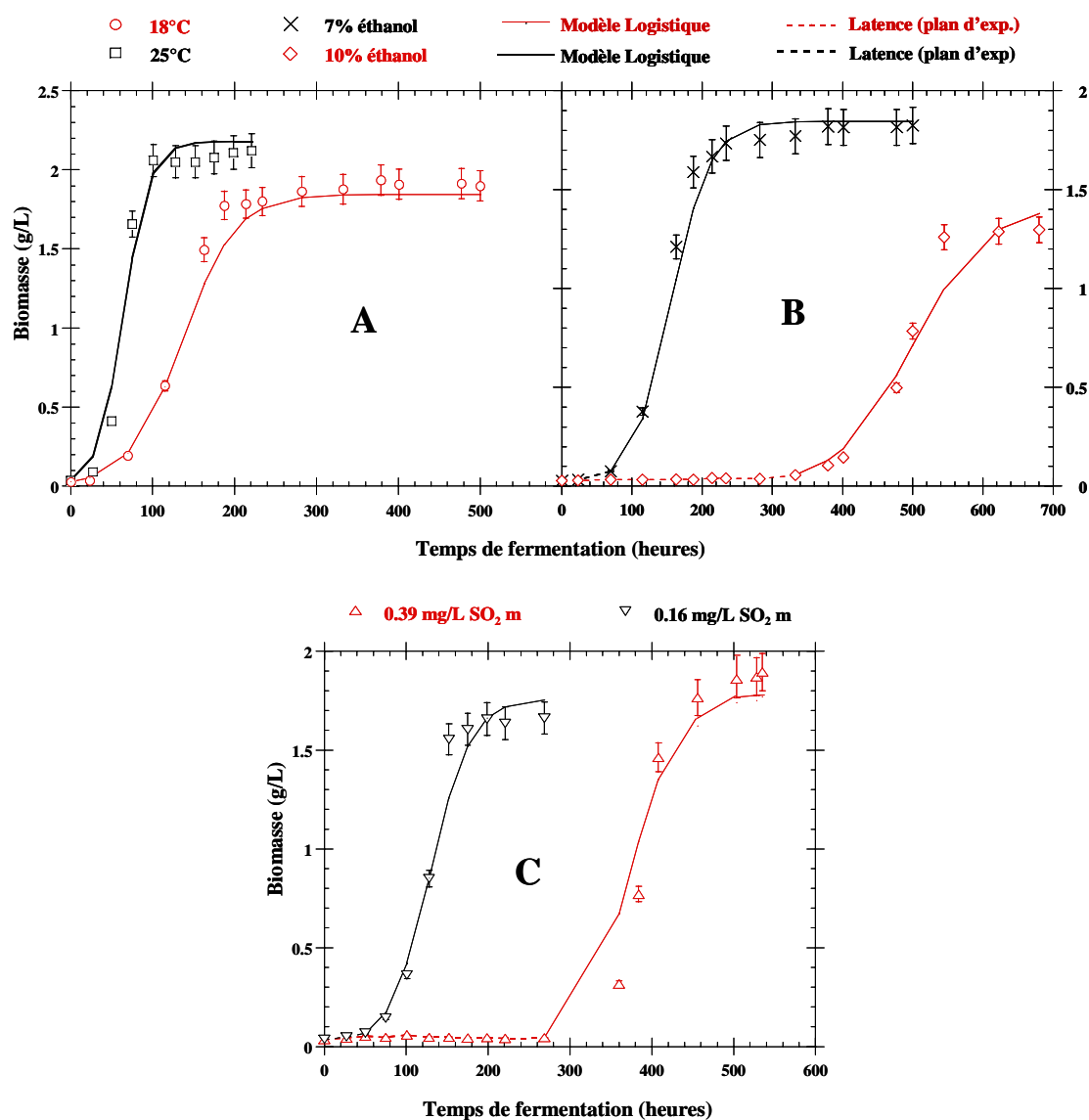


Figure 3.10. Comparaison des valeurs expérimentales de biomasse (symboles), et des valeurs prédites par le modèle (lignes). (A) Expériences à 7% d'éthanol v/v avec 0.16 mg/L de SO₂ moléculaire et à des températures de 25 et 18°C. (B) Expériences à 18°C, avec 0.39 mg/L de SO₂ moléculaire et à une concentration d'éthanol de 7 et 10% v/v. (C) Expériences avec 0.39 et 0.16 mg/L de SO₂ moléculaire initiale, à une température de 25°C, et 10% d'éthanol v/v.

Néanmoins il est nécessaire d'apporter quelques restrictions sur l'utilisation de ce modèle. En effet utiliser un plan d'expériences et une loi Logistique impose certaines contraintes. Pour un plan d'expériences, les polynômes ne sont applicables qu'entre les

bornes testées de nos paramètres. En dehors de ces bornes, il est impossible d'extrapoler le polynôme qui donne alors des valeurs aberrantes des variables de réponse.

D'autre part, tous les facteurs non inclus dans le plan d'expériences sont obligatoirement constants. Pour une utilisation correcte du modèle proposé, il faut donc que les autres paramètres tels que la composition du milieu, la taille de l'inoculum ou encore la nature de la souche soient identiques à ceux imposés dans nos expériences. Ceci limite donc aussi l'extrapolation de ce modèle.

Conclusions

Le plan d'expériences proposé nous a montré que des concentrations élevées en éthanol diminuent la concentration maximale de biomasse et le taux de croissance spécifique maximal, révélant ainsi l'effet inhibiteur de la concentration en éthanol sur la croissance. D'autre part, une augmentation de la température entraîne une augmentation du taux de croissance spécifique maximal et de la concentration de biomasse.

Pour le temps de latence, l'éthanol et le SO₂ moléculaire ont un effet très important. L'interaction de ces deux facteurs est également importante, augmentant le temps de latence. Il est intéressant de remarquer que le SO₂ retarde la croissance des *Brettanomyces* mais qu'il n'a pas d'influence sur μ_{\max} et sur X_{\max} . Des comparaisons entre nos résultats et les travaux menés par Gerbaux et coll. (2000) nous ont permis de confirmer l'importance des paramètres environnementaux sur le développement de cette levure indésirable dans l'industrie.

Enfin, un modèle prédictif de l'évolution de la population de *Brettanomyces* dans un milieu synthétique vin a été proposé. Il peut constituer un outil pour évaluer la vitesse de développement de *Brettanomyces* dans un vin. Toutefois, comme nous l'avons souligné, il faut rester prudent dans l'utilisation de ce modèle en travaillant dans ses limites d'application.

Chapitre IV:

Etude Génétique et

Métabolique des Souches du

Genre Brettanomyces.

CHAPITRE 4. ETUDE CINETIQUE ET METABOLIQUE DES SOUCHES DU GENRE *BRETTANOMYCES*.

Nous allons donner dans cette partie la synthèse des résultats expérimentaux concernant les réponses métaboliques et cinétiques des deux souches aux variations de deux facteurs environnementaux majeurs étudiées, la température et le pH. Il s'agit donc de comprendre le métabolisme de la levure sous les divers axes expérimentaux explorés. A cet effet, nous avons utilisé des modèles de connaissance qui permettent d'expliquer et comprendre ce qui se passe dans la cellule vis-à-vis des paramètres environnementaux. Nous mettrons aussi en évidence les différences métaboliques et cinétiques qui peuvent exister entre les souches *Brettanomyces* concernées.

Pour cela, l'influence des paramètres opératoires, à savoir la température et le pH est analysée d'un point de vue macroscopique : étude des profils de croissance, des aptitudes fermentaires, des relations existant entre les vitesses de croissance et les vitesses de production de métabolites (éthanol et acide acétique).

Nous présenterons donc dans ce chapitre une première partie d'étude sur l'influence de la température sur la croissance microbienne et sur la vitesse de production et de consommation avant de développer l'aspect modélisation. Dans une seconde partie nous présenterons l'influence du pH selon le même schéma.

4.1. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

La température est un des paramètres importants de la fermentation alcoolique. Elle peut en effet modifier les profils cinétiques de consommation et production, mais aussi le métabolisme de la levure.

Pour la souche B5d les expériences ont été réalisées en fermenteurs «Sétric type Set 2» en batch sur un milieu minimum et dans les conditions décrites dans le chapitre « matériel et méthodes » (aération=0.1 vvm ($k_La=6.4 \text{ h}^{-1}$) ; agitation = 250 tours/min ; pH initial = 4.0). L'influence de la température chez *B. bruxellensis* (B5d) a été étudiée à 6 niveaux différents entre 15 et 35°C (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 32°C, 35°C). La fermentation a été considérée comme terminée lorsque la concentration en glucose résiduel était inférieure à 1 g/L. Pour la souche *B. bruxellensis* (B2), les fermentations ont été réalisées en fermenteurs «New Brunswick BioFlo III », en batch, sur milieu

synthétique minimum avec un volume utile de 2 litres. Les conditions de fermentation sont : agitation= 250 tours/min, aération=0.1 vvm ($k_La= 4.9 \text{ h}^{-1}$); pH initial = 4.0. Pour évaluer la sensibilité de *Brettanomyces* (B2) à la température, nous avons testé trois niveaux: 30, 25 et 20°C.

Pour les deux souches étudiées, nous avons suivi tout au long de la fermentation la croissance de la population et sa viabilité ainsi que la consommation du glucose et les synthèses d'éthanol et d'acide acétique.

4.1.1. EFFET SUR LA CROISSANCE

4.1.1.1. Souche distillerie

Sur la **figure 4.1 (A)** est portée l'évolution de la biomasse pour les 6 températures testées. On observe que la concentration finale en biomasse reste du même ordre de grandeur pour les températures comprises entre 15 et 32°C soit environ 5.6 g/L. Mais, lorsque la température atteint les 35°C, nous observons une inhibition de la croissance de *Brettanomyces*. A cette température, la concentration en biomasse diminue de 65% (par rapport aux 5,6 g/L observés jusque là) et seulement 2 g/L de biomasse sont produits. En terme de nombre de cellules, nous avons obtenu environ 375 millions de cellules/mL pour les températures comprises entre 15 et 32°C alors qu'à 35°C cette population n'est plus que de 100 millions de cellules/mL.

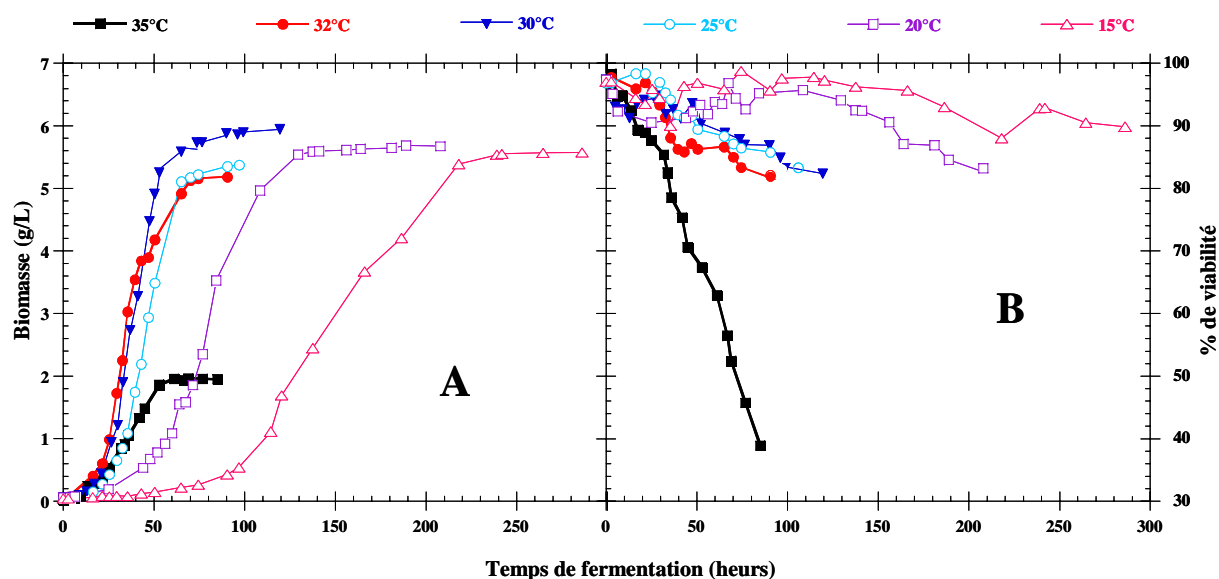


Figure 4.1. (A) Concentration en biomasse et (B) pourcentage de viabilité à différentes températures pour la souche *B. bruxellensis* (B5d).

Les courbes de croissance portées sur la **figure 4.1 (A)** montrent aussi qu'une augmentation de la température entre 15 et 32°C a un effet positif sur la vitesse de croissance. En conséquence la durée de la fermentation diminue : à 32°C la concentration maximale de biomasse a été obtenue aux 50 heures de fermentation, tandis qu'à 15°C la même production de biomasse a été obtenue 4.4 fois plus tard, c'est-à-dire aux 220 heures d'incubation. Cette observation est classique et selon Nedwell (1999) cette diminution de la vitesse de croissance des micro-organismes à basses températures est due à la réduction de la fluidité de la membrane qui entraîne une efficacité moindre des systèmes de transport transmembranaires.

L'effet inhibiteur d'une température trop élevée (sup. à 32°C) observé sur le niveau de population atteint ne se retrouve pas en termes de vitesse, mais est par contre bien marqué si l'on s'intéresse à la viabilité de la population. Ainsi, nous pouvons observer sur la **figure 4.1 B** que plus la température est élevée, plus le taux de viabilité diminue. On peut distinguer trois profils différents d'évolution du pourcentage de viabilité selon la température de fermentation:

- (1) A 15°C, on obtient le taux de viabilité le plus élevé (90%) et il reste constant tout au long de la fermentation.
- (2) Pour les températures comprises entre 20 et 32°C ce taux de viabilité diminue pour n'être plus que d'environ 80% à la fin de la fermentation.
- (3) A 35°C une chute importante de la viabilité est enregistrée dès les premiers temps de fermentation et le taux final est inférieur à 40%.

Cette mortalité élevée observée à 35°C augmente la durée de la fermentation et provoque son arrêt de la fermentation avec une concentration de glucose résiduelle élevée. Ce résultat peut être comparé avec ceux obtenus par différents auteurs sur l'effet de la température sur *Saccharomyces cerevisiae* (Ough, 1996; Nagodawithana et coll., 1974; Casey et coll., 1984; Torija et coll., 2002). Pour expliquer cet effet, Lucero et coll. (2000) suggèrent que l'accroissement de la température induit des dommages dans la structure de la membrane cellulaire et par conséquence une diminution de ses propriétés de transfert.

Un autre aspect que l'on peut analyser à ce niveau est l'évolution des vitesses spécifiques de croissance (μ). Les résultats obtenus pour les 6 températures testées sont portés sur la figure 4.2 (A). Ces courbes de vitesse peuvent être divisées en trois phases:

- (1) une première phase d'accélération,
- (2) une phase où la vitesse spécifique de croissance est à sa valeur maximale,
- (3) et finalement une troisième phase de décélération où la vitesse spécifique (μ) diminue jusqu'à des valeurs nulles.

Notons qu'aucune des croissances observées ne présente de phase de latence. En effet, quelle que soit la température, dès le début de la fermentation μ prend des valeurs positives. Pour une température donnée, le taux de croissance atteint très vite (20-30 heures) sa valeur maximale et diminue ensuite. Nous observons aussi que μ_{\max} augmente régulièrement lorsque la température augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale à 32°C ($\mu_{\max}=0.18 \text{ h}^{-1}$). Au-delà de cette valeur limite, une chute a lieu, probablement en raison de la désactivation progressive du système enzymatique contrôlant la croissance (figure 4.2 B), ces altérations entraînant une chute rapide du développement cellulaire.

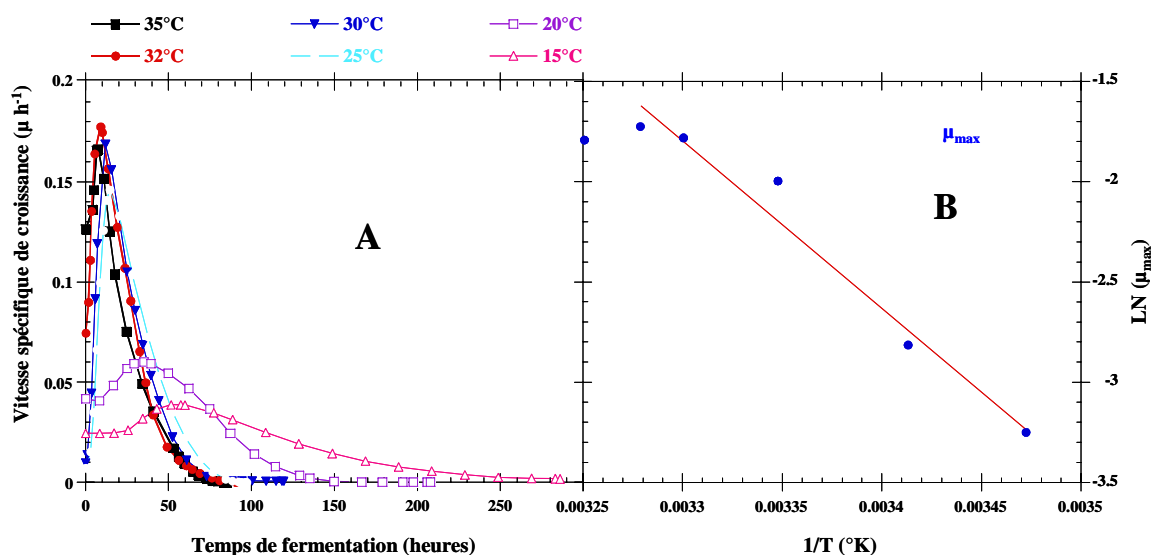


Figure 4.2. (A) Vitesse spécifique de croissance et (B) vitesse spécifique maximale de croissance à différentes températures (Application de l'équation d'Arrhenius) pour la souche *B. bruxellensis* (B5d).

4.1.1.2. Souche vin

La figure (4.3 A) présente les profils de production de biomasse obtenus lorsque nous avons fait varier la température pour la souche B2. Pour les températures de 25 et 30°C, la levure présente une bonne croissance tout au long de la fermentation. Dans cette gamme, la température n'a pas d'influence sur la biomasse maximale, nous avons obtenu les mêmes profils de croissance. En revanche, pour la température plus basse testée (20°C), la croissance de *B. bruxellensis* (B2) est affectée, la concentration en biomasse chute de 28% : à 30°C la valeur de biomasse maximale atteint environ 5.7 g/L tandis qu'à 20°C elle ne dépasse pas une concentration de 4.1 g/L.

D'autre part, l'abaissement de température de 5°C (de 25°C à 20°C) a provoqué un ralentissement très net de la culture, puisque le temps de fermentation a augmenté d'une vingtaine d'heures.

Si nous nous attachons maintenant au pourcentage de viabilité, on peut noter sur la figure 4.3 B que plus la température est élevée plus, taux de viabilité est faible. A 30°C on observe une diminution de la viabilité dès la 70^{ème} heure d'incubation. La viabilité finale atteint 80% et 84% à 30°C et 25°C, respectivement, alors que pour la température de 20°C le pourcentage de viabilité est encore d'environ 87% aux 260 heures de fermentation.

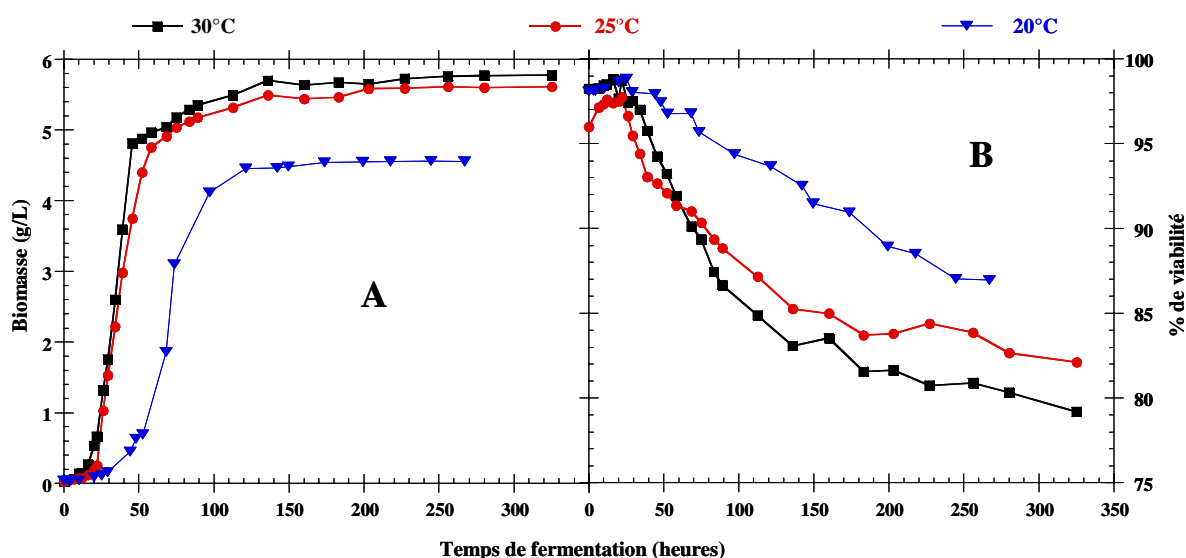


Figure 4.3. (A) Effet de la température sur la biomasse (B) Pourcentage de viabilité à différentes températures souche *B. bruxellensis* (B2).

Si nous regardons maintenant les profils de vitesse spécifique de croissance (μ) en fonction du temps (représentés sur la figure 4.4 A pour les trois températures), nous pouvons observer qu'aucune des croissances ne présente de phase de latence. En effet, dès le début de la fermentation on obtient des valeurs de μ positives. Cette observation commune aux deux souches confirme que les levures ont été actives dès l'inoculation et donc que les conditions de préculture ont été satisfaisantes. Cette figure montre aussi, que pour les températures de 30 et 25°C, la valeur de μ_{\max} est similaire soit, 0.24 h⁻¹ et 0.23 h⁻¹, respectivement. Pour la température de 20°C, la valeur de μ_{\max} est plus de deux fois inférieure (0.09 h⁻¹) à celles observées pour les autres températures. Nous retrouvons des observations identiques, qualitativement parlant, à celles faites précédemment pour la souche B5d.

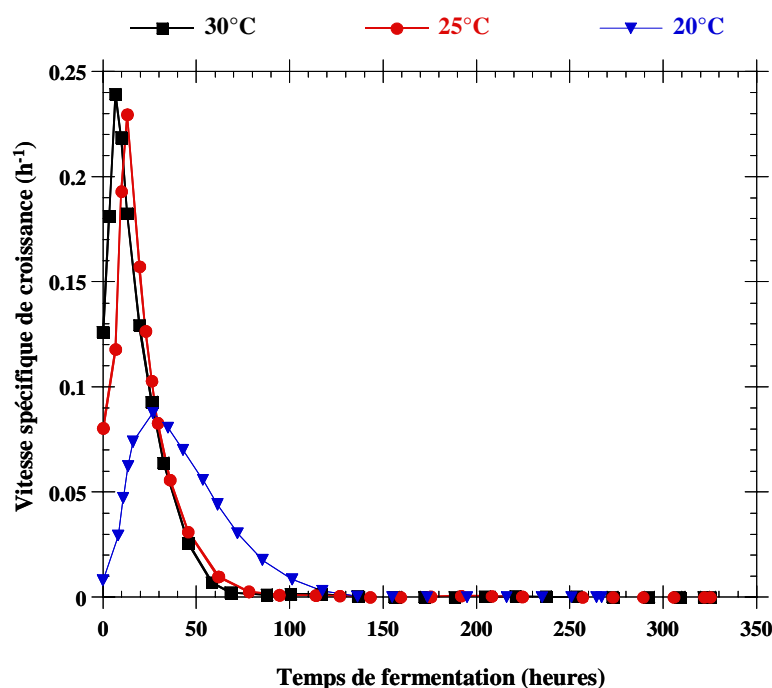


Figure 4.4. Evolution de la vitesse spécifique de croissance à différentes températures chez *B. bruxellensis* B2.

4.1.1.3. Calcul de l'énergie d'activation et du coefficient Q_{10} .

- **Energie d'activation**

L'effet de la température sur la croissance microbienne peut être évalué par le biais de l'énergie d'activation. L'équation d'Arrhenius est un outil bien connu pour des études sur la thermodynamique en bio-procédés (Arni et coll., 1999). Cette équation décrit la

dépendance générale de la vitesse d'une réaction vis-à-vis de la température. Elle se formule pour des processus microbiens comme:

$$\mu_{\max} = \mu_o e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (4.1)$$

où:

E_a : est l'énergie d'activation de la croissance microbienne (Kcal/mol)

μ_o : est le facteur pré-exponentiel (h^{-1}).

R : est la constante idéal des gaz (Kcal/mol.°K).

T : est la température (°K)

A partir des calculs de μ_{\max} pour chaque température, nous avons déterminé les paramètres de l'équation d'Arrhenius.

Nous avons calculé l'énergie d'activation (E_a) pour la souche B5d. La gamme de températures du calcul a été entre 15 et 32°C. La valeur de l'énergie d'activation obtenue est de 16.61 kcal/mol et le facteur pre-exponentiel est de $1.56 \times 10^{11} h^{-1}$ (coefficient de corrélation $R^2=95$). (**Figure 4.2 B**). Cette valeur est comparée à celles rapportées pour d'autres levures (**Tableau IV.1**). On peut voir que cette souche est moins sensible à la température que *Schizosaccharomyces pombe* qui présente une énergie d'activation nettement plus importante. Cette dernière levure a besoin de plus d'énergie pour réaliser ses réactions métaboliques. En revanche, quand on compare l'énergie d'activation de *B. bruxellensis* avec *S. cerevisiae* ou *P. Tannophilus* on peut dire que ces levures ont des comportements similaires avec peut être une sensibilité un peu plus marquée pour *B. bruxellensis* qui a une énergie d'activation un peu plus haute.

Tableau IV.1. Comparaison de l'énergie d'activation et la valeur du Q_{10} sur la croissance de différentes levures.

Micro-organisme	E_a (Kcal/mol)	Q_{10} entre 15-25°C	Auteur
<i>B. bruxellensis</i> (B5d)	16.61	3.76	Ce travail (Castro 2007)
<i>Schizosaccharomyces.</i> <i>pombe</i>	26.2	3.33	Taillandier, P. (1990)
<i>Saccharomyces.</i> <i>cerevisiae</i>	12.29	2.05	Saez, C. (1986)
<i>P. tannophilus</i>	13.59	1.86	Sánchez, S. et coll. (2004)

La valeur d'énergie d'activation indique si le processus se situe dans un régime biologique ou dans un régime de diffusion. Un régime biologique implique que la température a une influence directe sur les paramètres cinétiques de croissance tandis que dans un régime de diffusion ce sont des phénomènes physiques comme le transfert d'oxygène ou le transfert de masse qui limitent la réaction. Il est reconnu que pour une valeur de l'énergie d'activation égale ou supérieure à 12 kcal/mol le processus se trouve dans un régime biologique (Sánchez et coll., 2004 ; Serra et coll., 2005). Sur ces bases, et avec les résultats obtenus on peut alors conclure que nous nous situons dans un régime biologique ($E_{aB. bruxellensis} = 16.61 \text{ Kcal/mol}$).

- **Coefficient Q_{10}**

Un autre outil pour évaluer l'influence de la température sur la croissance (ou l'activité d'un microorganisme) est le « Q_{10} ». Ce paramètre représente l'augmentation de la vitesse de réaction quand il y a une augmentation de la température de 10°C. La valeur de Q_{10} est calculée en utilisant l'équation suivante (Urbano et coll., 2005):

$$Q_{10} = \left(\frac{K_2}{K_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)} \quad (4.2)$$

où :

T_2 : est la température la plus élevée et T_1 : est la température la plus basse

K_2 : est la vitesse de réaction la plus élevée, et K_1 : est la vitesse de réaction la plus basse.

De la même façon que l'énergie d'activation, la valeur de Q_{10} peut être utilisée pour savoir si le processus est physique ($Q_{10} \leq 1$) ou biochimique ($Q_{10} \geq 2$) (de diffusion ou biologique). Le coefficient Q_{10} pourrait aussi être un outil utile pour indiquer la sensibilité de la réaction à une augmentation de température dans une gamme définie en mesurant les changements de vitesse de croissance. D'après les **tableaux IV.1 et IV.2**, pour la souche B5d le facteur Q_{10} montre des changements importants selon les températures considérées: entre 15 et 25°C la valeur de Q_{10} est 3.76 tandis qu'entre 20 et 30 °C cette valeur diminue d'une unité ($Q_{10} = 2.80$). Selon Larcher (2000), les valeurs de Q_{10} sont plus élevées à basses températures, parce que dans de telles conditions les

réactions biochimiques impliquées sont limitées par une basse activité enzymatique. Par contre, à températures élevées (au-delà de la température seuil), il y a une diminution de la valeur de Q_{10} puisque dans ces conditions apparaît une limitation physique, par exemple, la diminution de la diffusion d'oxygène (la valeur de K_L diminue).

Si l'on compare les valeurs des coefficients de Q_{10} pour les deux souches de *Brettanomyces* étudiés dans ce travail (B5d et B2) pour des températures entre 20 et 30°C il apparaît que les deux souches présentent des sensibilités à la température identiques, (**tableau IV. 2**).

Tableau IV.2. Comparaison de la valeur du Q_{10} sur levures *B. bruxellensis*.

Souche	Q_{10} (entre 20-30°C)
<i>B. bruxellensis</i> (B5d)	2.80
<i>B. bruxellensis</i> (B2)	2.7

L'énergie d'activation et le Q_{10} sont des outils qui permettent d'évaluer l'effet de la température sur la croissance microbienne. Cependant, la notion d'énergie d'activation « Ea » est plus significative puisque c'est une valeur constante établie sur une large gamme de température. Au contraire, le « Q_{10} » est un paramètre qui donne des résultats variables selon la gamme de température de calcul.

4.1.2. EFFET SUR LA CONSOMMATION ET SUR LA PRODUCTION

Cette partie regroupe les profils cinétiques de consommation du glucose, de production d'éthanol et d'acide acétique pour les deux souches testées.

4.1.2.1. Souche distillerie

La **figure 4.5** montre les évolutions des concentrations en glucose dans le milieu de culture pour les 6 températures étudiées. Pour toutes les expériences, le glucose a été totalement consommé, sauf à 35°C où un arrêt de la fermentation a été observé. A cette température, seulement 15 g/L de glucose ont été consommés par la levure. Les basses températures exercent un effet négatif sur la vitesse de consommation du glucose : ainsi, à 15°C la vitesse de consommation de glucose est plus trois fois plus faible qu'à 32°C.

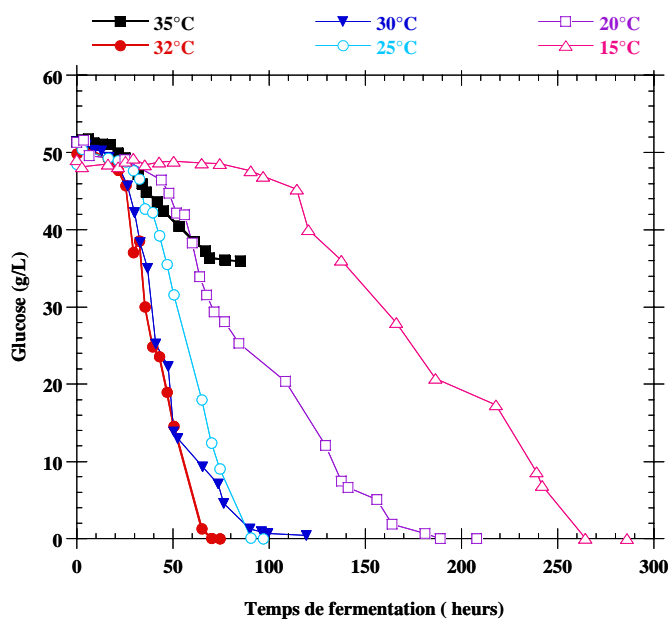


Figure 4.5. Consommation de glucose à différentes températures pour *Brettanomyces bruxellensis* (B5d).

La **figure 4.6** montre l'évolution des concentrations en éthanol et en acide acétique, les deux produits principaux de la fermentation chez *B. bruxellensis*. La concentration en éthanol varie entre 18 et 20 g/L pour les températures comprises entre 15 et 32°C. La concentration en acide acétique varie entre 3.4 et 4 g/L. En revanche, à 35°C, on a observé un arrêt de la fermentation aux 90 heures d'incubation et seulement 6.5 g/L d'éthanol et 0.58 g/L d'acide acétique ont été produits, vraisemblablement en raison de la forte augmentation de la lyse cellulaire. Aucun des produits de fermentation (éthanol et acide acétique) n'a exercé d'inhibition sur la consommation de glucose pour les fermentations réalisées entre 15°C et 32°C. De la même façon que pour la production de biomasse, les températures élevées ont favorisé les vitesses de production d'éthanol et d'acide acétique.

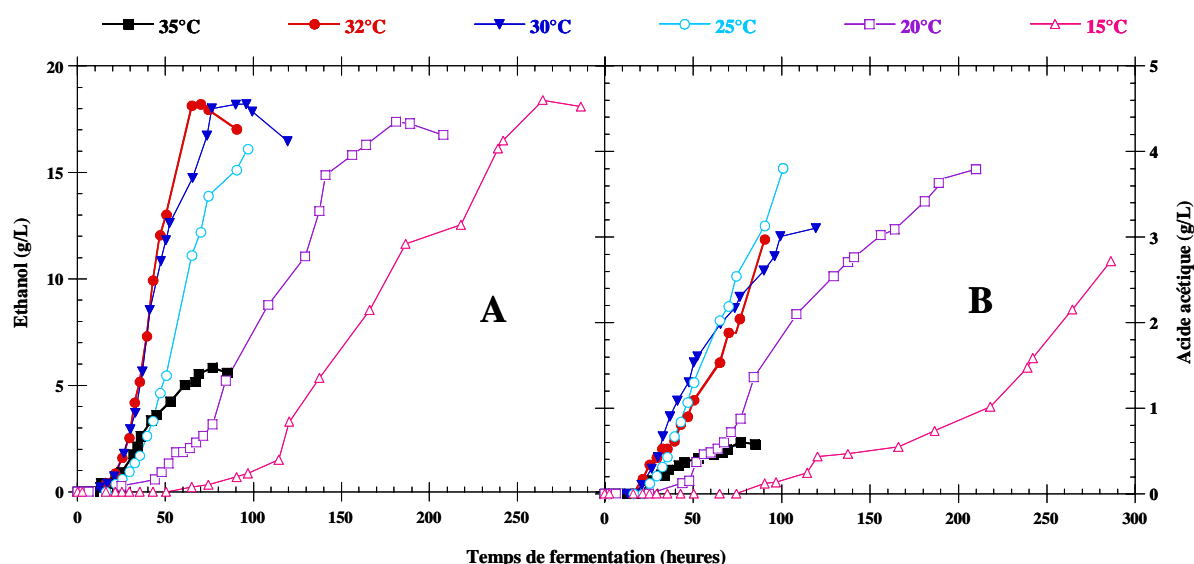


Figure 4.6 (A) Evolution de l'éthanol au cours du temps et (B) profil de l'acide acétique à différentes températures pour la souche *B. bruxellensis* (B5d).

Dans nos essais, nous avons observé une légère diminution en éthanol à la fin de la fermentation (**figure 4.6 A**). Nous pouvons supposer que l'éthanol a été converti en acide acétique. En effet, comme nous l'avons précédemment établi, dans des conditions aérobies, la levure *Brettanomyces* peut employer l'éthanol comme substrat pour produire de l'acide acétique (Aguilar et coll., 2003). Néanmoins, nous n'allons pas étudier ici ce phénomène de consommation d'éthanol pour la souche B5d. Ce point sera discuté plus loin.

Ces profils cinétiques peuvent être comparés avec ceux obtenus par Freer (2002) qui a étudié l'effet de la température à 24 et 30° sur des levures du genre *Brettanomyces/Dekkera*. Dans ces conditions, il a constaté que ces levures produisent l'acide acétique plus rapidement à 30°C. Lorsque la culture est faite à 30°C, les fermentations ont été accomplies en 3-5 jours, alors que les cultures développées à 24°C avaient besoin de 5-7 jours pour consommer complètement le sucre dans le milieu de culture. Si l'on se focalise seulement sur nos résultats obtenus à 25 et 30 °C on ne peut pas, dans notre cas conclure, comme Freer. Nous n'avons en effet aucune différence significative sur la vitesse de production de l'acide acétique. Une température de 25°C paraît au contraire plus favorable pour la production d'acide acétique. Cette simple différence conforte l'idée de la difficulté de comparer les études réalisées sur *Brettanomyces* du fait de la forte variabilité de cette levure.

4.1.2.2. Souche vin

Les profils cinétiques de consommation du glucose pour les trois températures sont portés sur la **figure 4.7**. Ce graphique met en évidence l'effet de la température sur la consommation du glucose. Si nous comparons les profils cinétiques, nous nous apercevons que la vitesse de consommation du glucose varie en fonction des différentes températures. Par exemple, les vitesses moyennes de consommation de glucose sont plus élevées à 30°C qu'à 25 et 20°C, les valeurs s'échelonnent de 0.91 g/L/h à 30°C à 0.7 et 0.38 g/L/h pour les autres températures (25 et 20°C respectivement).

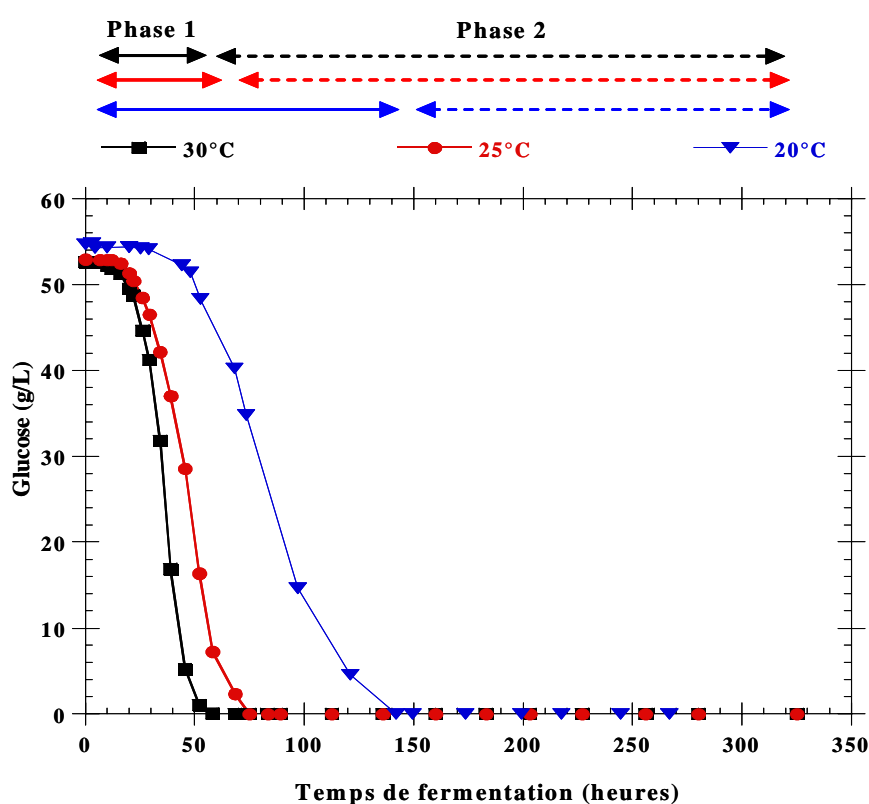


Figure 4.7. Profil de consommation de glucose à différentes températures pour la souche *B. bruxellensis* (B2).

On observe aussi que dans tous les essais le glucose a été totalement consommé. Les températures les plus élevées ont un effet stimulant sur la consommation de glucose et sur la synthèse cellulaire. A 30°C, le glucose est consommé totalement au bout de 58 heures de fermentation, tandis qu'à 25°C et 20°C l'épuisement du glucose nécessite jusqu'à 75 heures et 142 heures d'incubation, respectivement.

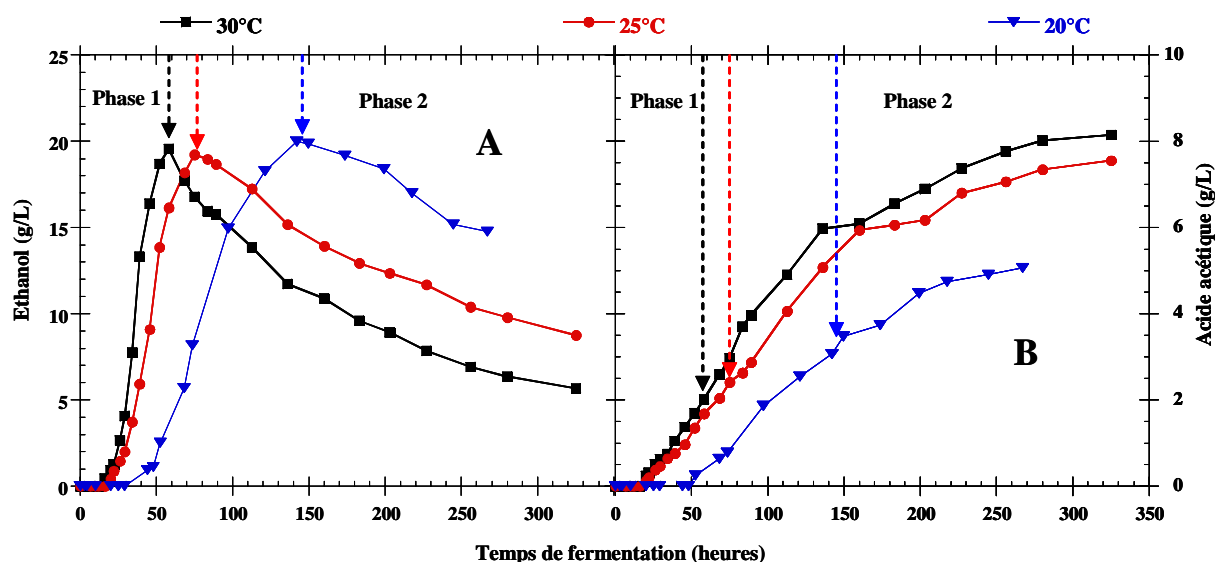


Figure 4.8. (A) Evolution de l'éthanol au cours de temps et (B) profil cinétique de l'acide acétique à différentes températures pour la souche *B. bruxellensis* (B2).

Il est intéressant d'observer sur la **figure 4.8**, l'évolution au cours de temps de l'éthanol et de l'acide acétique. Plus la température augmente, plus rapide est la production des sous-produits de fermentation. Ainsi, l'augmentation de la température a un effet positif sur la production de ces composés. La vitesse moyenne de production d'éthanol obtenue à 30°C est de l'ordre de 0.35 g/L/h alors que pour une température de 20°C la vitesse est plus de 3 fois inférieure (0.11 g/L/h). Nous avons dans ce cas un ralentissement de la réaction qui s'élève à 68%. Pour la production de l'acide acétique on observe le même phénomène de diminution de la vitesse de production quand la température diminue.

On peut également noter sur la **figure 4.8 A** que la levure produit entre 20 et 22 g/L d'éthanol pour les trois températures. Un fois le glucose épuisé, on observe une diminution de la concentration d'éthanol produit. Ce dernier phénomène intervient après la 60^{ème} heure de culture et coïncide avec la phase stationnaire de la croissance pour la température de 30°C. Pour les autres températures ce comportement est aussi présent mais quelques heures plus tard. Cette consommation d'éthanol à des fins de production d'acide acétique a déjà été rapportée par Wijsman et coll. (1984), Gilis (1999) et Aguilar (1998).

Une analyse plus fine (**figure 4.8 B**) met en évidence deux phases de production d'acide acétique :

- (1) à partir de glucose
- (2) à partir d'éthanol quand le glucose est épuisé.

Dans un premier temps, lorsque le glucose est la source de carbone (phase 1) on observe que la production d'acide acétique pour les trois températures est de l'ordre de 2 à 3 g/L. Mais, par la suite, quand *Brettanomyces* utilise l'éthanol comme substrat carboné (phase 2), la production d'acide acétique est plus importante et par exemple, à 30°C la levure est capable de produire 2 fois plus d'acide acétique (environ 6 g/L) lors de la phase 2.

4.1.3. ANALYSE CINETIQUE ET MODELISATION

Les résultats expérimentaux précédents permettent d'envisager la modélisation des réactions de croissance et de production des deux souches étudiées.

Comme le montrent les **figures 4.1 (A)** et **4.3 (A)**, le profil de production de biomasse présente une forme sigmoïde et sans phase de latence. On peut alors tester le modèle logistique et si son adéquation s'avère correcte l'utiliser pour calculer les vitesses de croissance (**équation 3.6 chapitre 3**). Les erreurs expérimentales liées aux mesures (et qui sont importantes sur la mesure de la concentration en biomasse) sont ainsi corrigées.

- **Modélisation par le modèle Logistique**

Les **figures 4.9 (pour la souche B5d)** et **4.10 (pour la souche B2)** montrent la bonne corrélation entre les points expérimentaux et le modèle pour les concentrations en biomasse aux différentes températures testées. Pour la souche B2, la modélisation n'a porté que sur la première partie de la fermentation, c'est-à-dire lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone. La fermentation est alors considérée comme terminée lorsque le glucose a été totalement consommé.

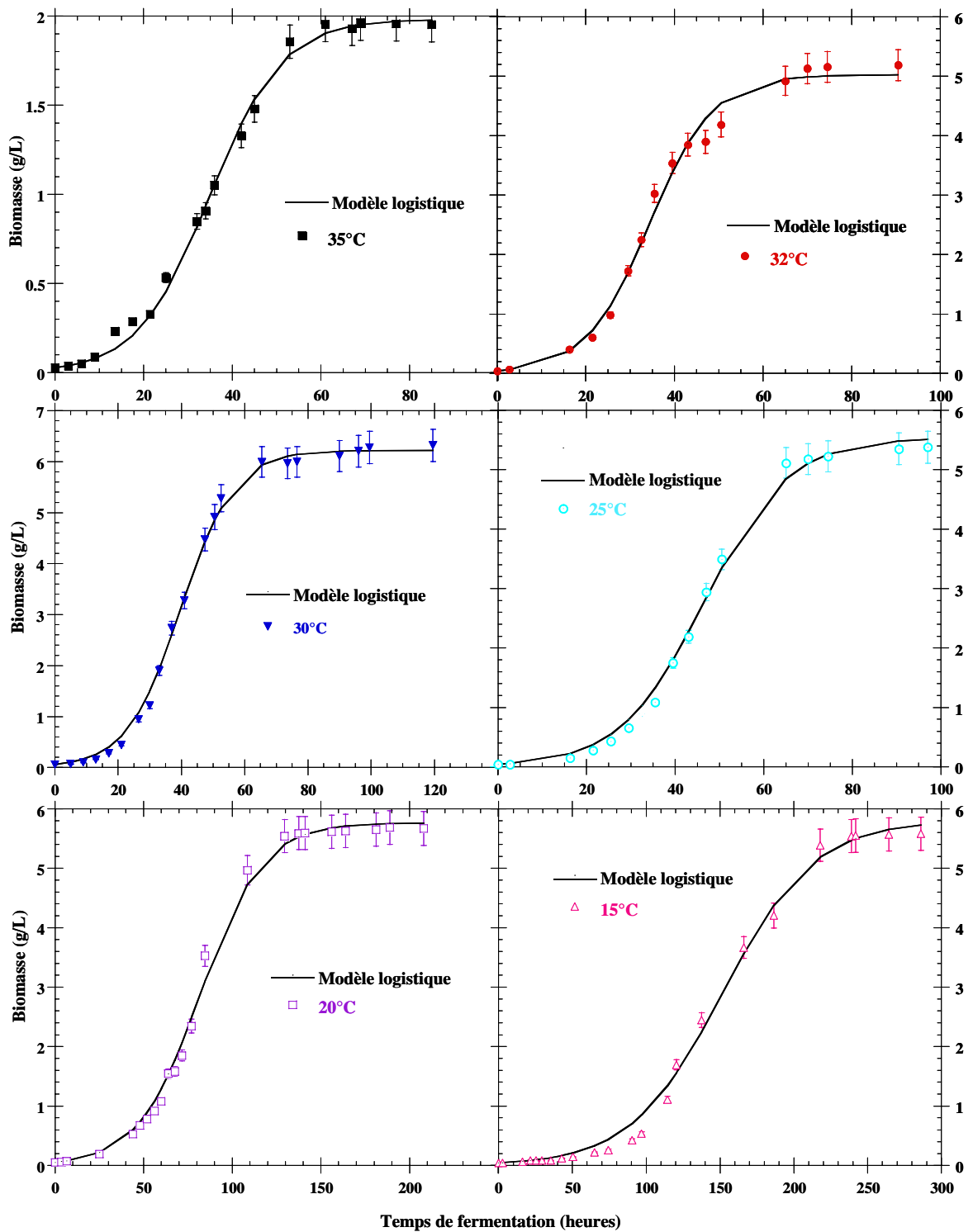


Figure 4.9. Représentation de la croissance par le modèle Logistique aux différentes températures. (Souche distillerie B5d).

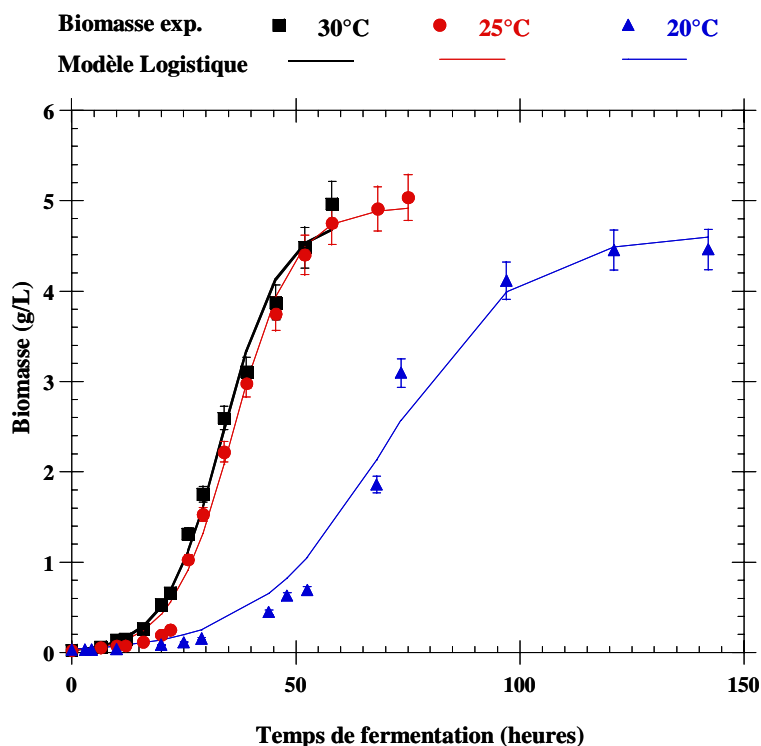


Figure 4.10. Représentation de la concentration de biomasse par le modèle Logistique à différentes températures. (Souche vin B2).

- **Application du formalisme de Luedeking-Piret**

Si on se reporte maintenant aux figures 4.1A et 4.6 (pour la souche B5d) et 4.3 A et 4.8 (pour la souche B2), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe une corrélation entre la vitesse de croissance et les vitesses de production d'éthanol et d'acide acétique pour toutes les températures étudiées. Afin de valider cette hypothèse, nous avons représenté le rapport entre la production de biomasse et la production des sous-produits de fermentation (**Figure 4.11** souche B5d et **figure 4.12** souche B2).

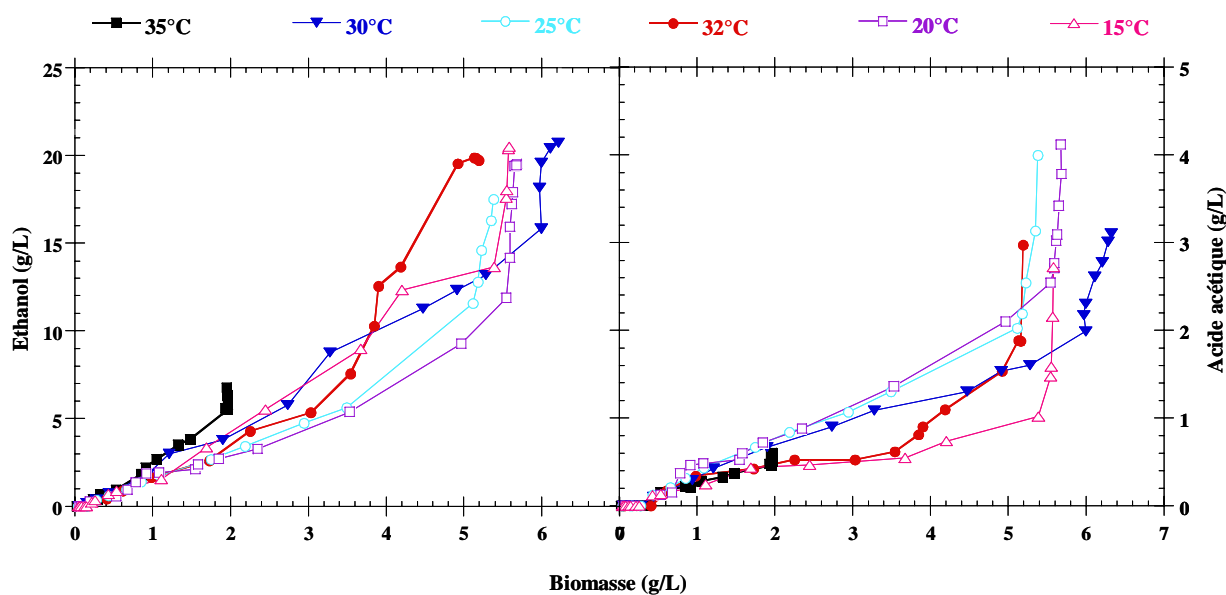


Figure 4.11. Concentration d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en biomasse à différentes températures. (Souche distillerie B5d)

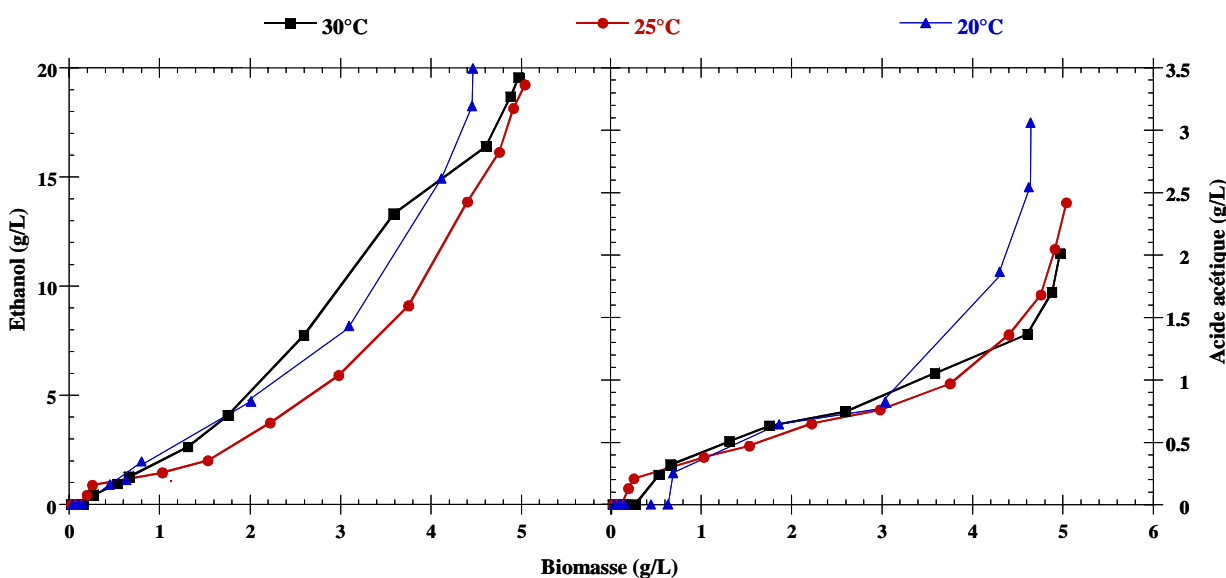


Figure 4.12. Concentration d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en biomasse à différentes températures. (Souche vin B2)

Les **figures 4.11** et **4.12** mettent en évidence un rapport linéaire entre la biomasse et les produits de fermentation pour les basses valeurs de biomasse. Mais, à la fin de la fermentation (quand la concentration de biomasse est constante) les productions d'éthanol et d'acide acétique apparaissent comme non liées à la croissance cellulaire (le point de rupture est indiqué par la flèche).

Le modèle de Luedeking-Piret (Luedeking-Piret, 1959) est alors susceptible de bien traduire ces observations. Il s'écrit:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4.3)$$

Avec :

X : la concentration de biomasse

P : la concentration d'éthanol et d'acide acétique

α : la constante associée à la vitesse de croissance

β : la constante associée à la concentration en biomasse

Cette équation devient après substitution du terme croissance par l'équation (3.7 chapitre 3) et intégration :

$$P(t) = P_o + \alpha K_1 + \beta K_2 \quad (4.4)$$

où:

$$K_1 = X - X_o \quad (4.5)$$

et,

$$K_2 = \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left[1 - \frac{X_o}{X_{\max}} (1 - e^{\mu_{\max} t}) \right] \quad (4.6)$$

Les paramètres alpha et bêta sont identifiés pour chaque expérience en ajustant le modèle aux données expérimentales.

Sur les **figures 4.13** et **4.14** (souche B5d) et la **figure 4.15** (souche B2) sont portées les valeurs expérimentales et les courbes (éthanol et acide acétique) issues du modèle pour toutes les températures étudiées. On observe qu'il existe une bonne adéquation entre les données expérimentales et les données calculées par le modèle.

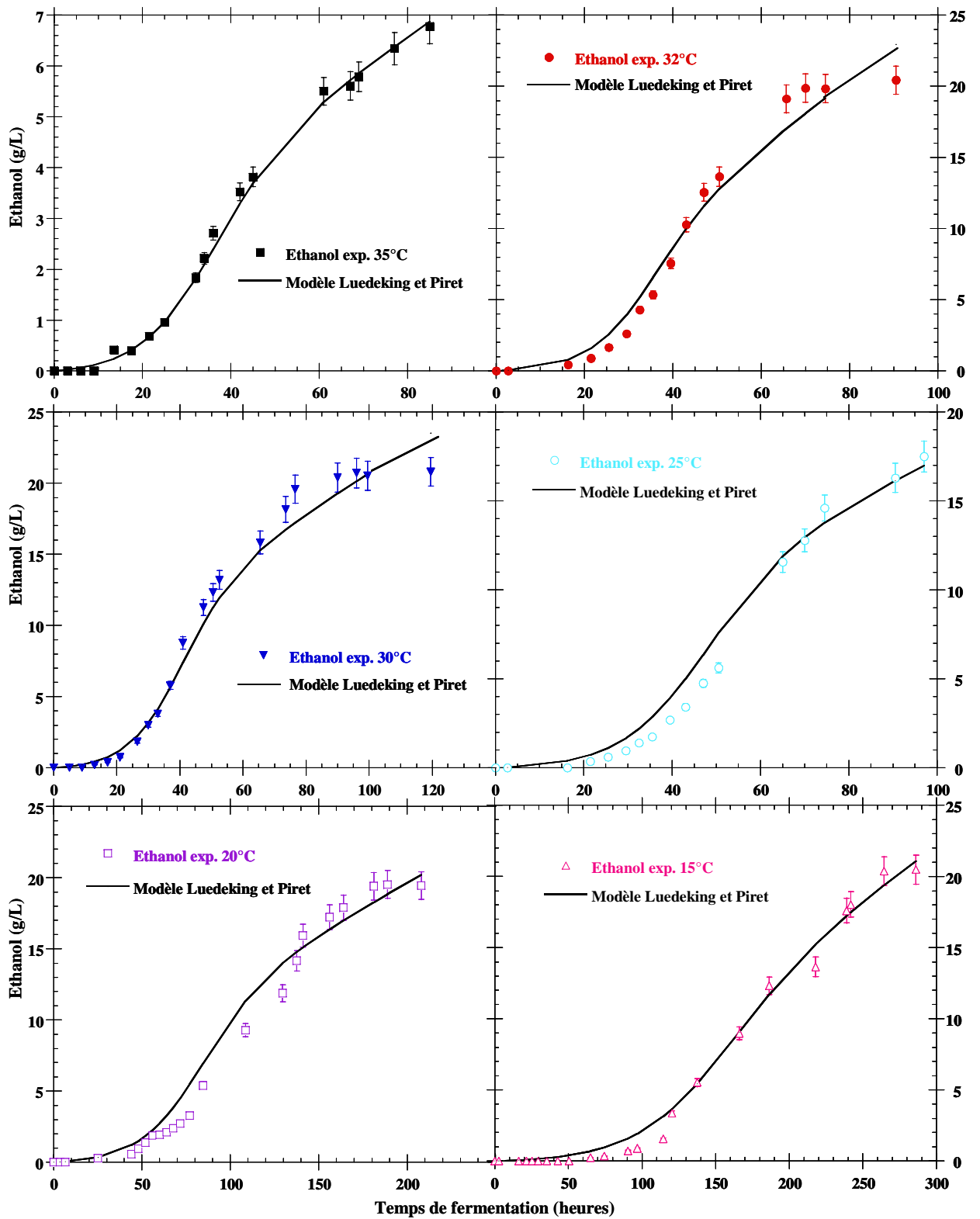


Figure 4.13. Représentation de la concentration de l'éthanol par le modèle de Luedeking et Piret à différentes températures. (Souche distillerie B5d)

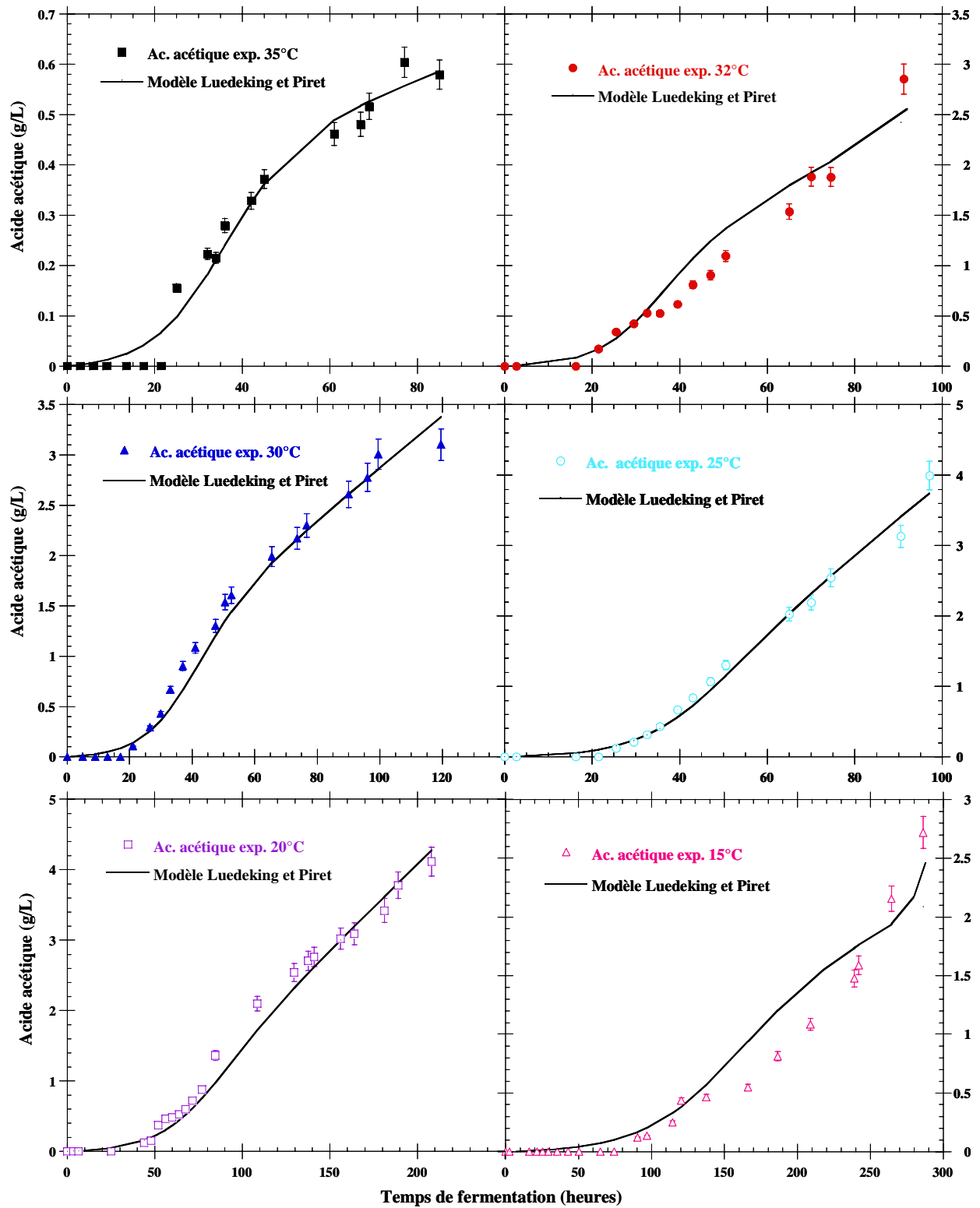


Figure 4.14. Représentation de la concentration d'acide acétique par le modèle de Luedeking et Piret à différentes températures. (Souche distillerie B5d)

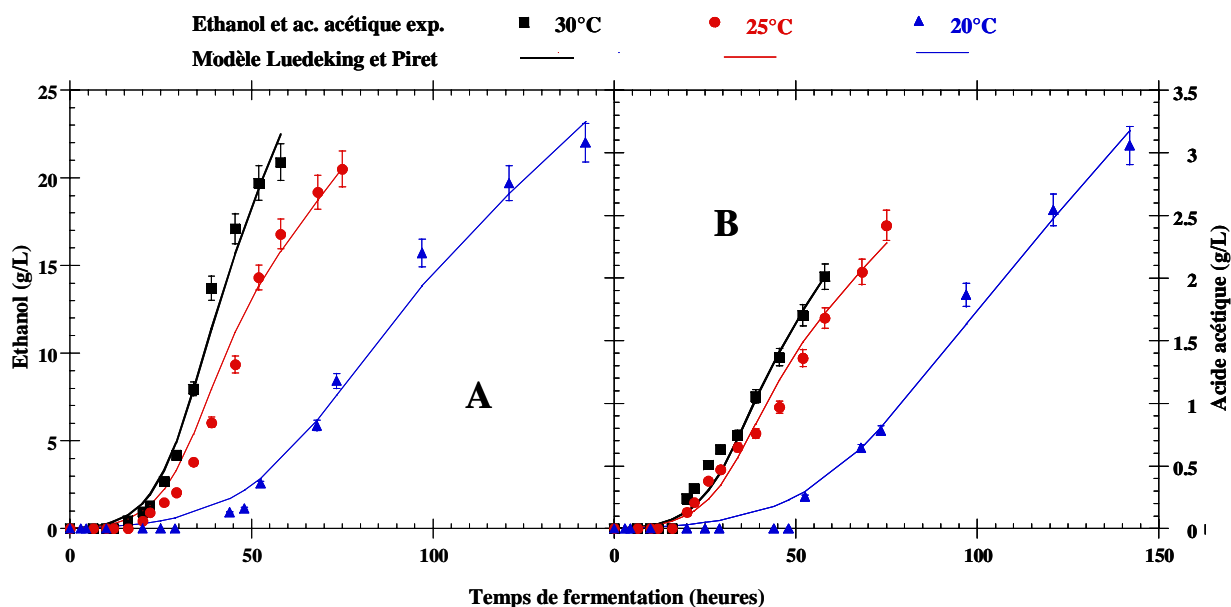


Figure 4.15. Représentation de la concentration d'éthanol et d'acide acétique par le modèle de Luedeking et Piret à différentes températures. (Souche vin B2)

- **Analyse statistique**

Une analyse statistique a été ensuite menée afin de déterminer le poids et l'influence des paramètres alpha et bêta. L'analyse d'ANOVA montre qu'alpha et bêta sont tous les deux significatifs avec une probabilité supérieure à 95% pour les deux souches testées. Un coefficient de corrélation supérieur à 0.95 a été obtenu pour tous les niveaux de température et pour les deux souches testées. Ces paramètres alpha et bêta ont des valeurs non nulles, ce qui signifie que les réactions de production (éthanol et acide acétique) sont partiellement couplées à la réaction de croissance. Ainsi, le modèle proposé qui associe le modèle logistique pour la croissance au formalisme de Luedeking et Piret pour les réactions de production d'éthanol et d'acide acétique est bien adapté aux données expérimentales.

Il est intéressant de noter que l'identification paramétrique a donné pour alpha une valeur constante quelle que soit la température et la fermentation alors que les valeurs de bêta varient avec la température (**tableau 4.3** souche B5d et **tableau 4.4** souche B2).

Ces résultats peuvent être biologiquement expliqués comme suit:

(1) La capacité des cellules à produire de l'éthanol et de l'acide acétique augmente avec la température proportionnellement à sa capacité à se reproduire (α constant). Nous pouvons alors imaginer que le même système métabolique est impliqué dans les deux phénomènes et que l'activité enzymatique de ce système augmente avec la température jusqu'à atteindre la température de désactivation.

(2) Existence d'une autre manière pour que la cellule produise de l'éthanol et de l'acide acétique sans qu'il y ait production de biomasse ($\beta \neq 0$). Ainsi, même s'il n'y a aucune croissance, l'éthanol et l'acide acétique sont produits (pendant la phase stationnaire de la croissance) et la vitesse de production est ici liée à la quantité de biomasse. L'augmentation de β reflète l'augmentation de la capacité d'une cellule à produire de l'éthanol et de l'acide acétique avec la température, certainement en augmentant son activité enzymatique.

Tableau IV.3. Valeurs des paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret à différentes températures et ses coefficient de corrélation. (Souche distillerie B5d)

Température (°C)	Ethanol			Acétique		
	α	β	R^2	α	B	R^2
15	1.967±17.8%	0.013±23.6%	0.99	0.213±20.4%	0.001±17.4%	0.96
20		0.012±18.0%	0.98		0.004±10.1%	0.99
25		0.022±21.4%	0.98		0.009±17.4%	0.99
30		0.042±31.3%	0.98		0.006±14.0%	0.99
32		0.047±35.5%	0.98		0.005±16.3%	0.97
35		0.031±12.5%	1		0.002±7.3%	1

Tableau IV.4. Valeurs des paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret à différentes températures et ses coefficients de corrélation. (Souche vin B2)

Température (°C)	Ethanol			Acétique		
	α	B	R^2	α	β	R^2
20	2.128±21.5%	0.040±28.5%	0.99	0.198±23.7%	0.007±21.3%	0.99
25		0.052±20.1%	0.99		0.007±22.3%	0.99
30		0.091±20.4%	0.99		0.008±21.4%	0.99

Si l'on regarde les valeurs de alpha et bêta obtenus pour les deux souches (**Tableau IV.3 et IV.4**) on montre que ces paramètres ne présentent pas la même sensibilité sur le métabolisme de la levure (**Figure 4.16**). Ainsi, il n'y a pas un lien entre la production d'éthanol et la production d'acide acétique. Il est donc possible que dans le métabolisme de *Brettanomyces* soient impliquées deux réactions différentes: une pour produire l'éthanol et une autre pour produire de l'acide acétique à partir du glucose comme substrat.

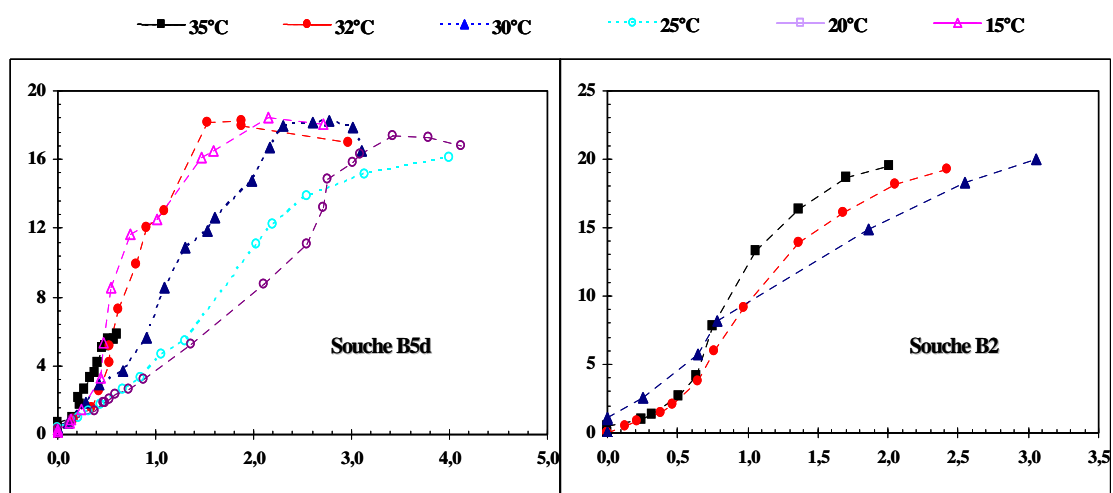


Figure 4.16. Production d'éthanol en fonction de la production d'acide acétique.

D'autre part, les résultats présentés sur l'analyse cinétique sont en désaccord avec ceux rapportés par Aguilar (1998). Elle a considérée la valeur de bêta comme négligeable. La différence entre nos résultats et ceux rapportés par Aguilar peut s'expliquer par le fait que les valeurs obtenues de bêta étaient très faibles.

4.1.4 Conclusions sur l'effet de la température

Cette étude a permis de cerner, l'influence de la température sur la croissance, la consommation du glucose et la production d'éthanol et d'acide acétique de deux souches de *Brettanomyces* issues de deux écosystèmes très différents. Les principales conclusions sur l'effet de la température sont reprises ci-dessous :

Souche distillerie

L'effet de la température sur la souche B5d a été étudié entre 15 et 35°C.

- Dans une gamme de température entre 15 et 32°C, la température n'a pas montré d'influence sur le niveau de population atteint.
- Un arrêt de la fermentation a été observé lorsque la culture a été réalisée à 35°C. A cette température, une forte inhibition dès le début de la fermentation sur la consommation de glucose (69% de glucose résiduel), sur la synthèse de biomasse (2 g/L), sur la production d'éthanol (5.6 g/L), sur la production d'acide acétique (0.60 g/L) et une réduction importante de la viabilité finale (40%) ont été enregistrées.

Souche vin

L'effet de la température a été étudié entre 20 et 30°C pour la souche B2.

- Entre 25 et 30°C, la température d'incubation n'a pas d'influence sur la concentration de biomasse maximale obtenue. Par contre, à 20°C, nous avons observé une diminution de la production de biomasse de 28%. A cette température le pourcentage de viabilité obtenu a été de 90% jusqu'à la fin de la fermentation, tandis que pour les autres températures le pourcentage a été inférieur (autour de 80%).
- Pour la phase de consommation d'éthanol (phase 2), nous avons montré que la température a un effet positif sur la consommation d'éthanol et la production

d'acide acétique. Plus la température est élevée plus la consommation d'éthanol et la production d'acide acétique sont importantes.

Deux souches:

- Pour les deux souches nous avons montré qu'une température élevée a un effet bénéfique sur la vitesse de croissance spécifique maximale jusqu'à un certain seuil (32°C souche B5d et 30°C souche B2).
- L'estimation de l'énergie d'activation et du coefficient Q_{10} nous a permis d'évaluer l'effet de la température sur la croissance de *Brettanomyces*. Ainsi, nous avons démontré que notre système est régulé par les réactions métaboliques du micro-organisme ($E_a > 12$ kcal/mol et $Q_{10} > 2$) et non par une limitation physique.
- La température n'a pas d'effet sur la quantité de substrat consommé ou de produits formés. Mais, une augmentation de la température favorise les vitesses de consommation du glucose et les vitesses de production de sous produits de fermentation.
- Un modèle associant le modèle Logistique et le modèle de Luedeking et Piret pour la phase de consommation de glucose (phase 1) a donné une bonne représentation des valeurs expérimentales. Il a permis de valider que les réactions de production (d'éthanol et d'acide acétique) sont partiellement liées à la croissance.
- Enfin, nous avons montré que le paramètre associé à la croissance (α) est constant pour toutes les températures étudiées et que la valeur de β (lié à la population) varie en fonction de la température et de la nature de la souche.

4.2. INFLUENCE DU PH (SOUCHE *B. BRUXELLENSIS* B5d)

Après avoir examiné l'influence de la température chez ces deux souches de *Brettanomyces*, nous nous sommes intéressées à l'impact du pH sur l'activité de la souche de *B. bruxellensis* isolée de l'unité de production d'alcool (B5d).

En fermentation alcoolique le pH est un paramètre très important, réputé agir sur l'activité métabolique de la levure et moduler la synthèse des acides formés au cours de la fermentation. Il nous a donc paru indispensable d'étudier le rôle du pH sur cette souche de *Brettanomyces bruxellensis* compte tenu des incidences possibles sur le procédé industriel (pertes de productivité, modification des compositions des milieux en fin de fermentation). Pour cela, nous avons réalisé des cultures avec régulation et sans régulation du pH.

Cette étude a été réalisée en culture batch sur des fermenteurs type « New Brunswick Bioflo III » de 2 litres de volume utile. L'ensemencement est effectué à 3.10^6 cell/mL à partir de levain en fin de phase de croissance (avant le début de la phase stationnaire). La température de fermentation a été fixée à 30°C, l'agitation est de 250 tours/min, avec un aération de 0.1 vvm ($k_{La} = 4.9 \text{ h}^{-1}$). La valeur de pH initial a été fixée à 4.0 et dans les cas de régulation, elle a été faite en utilisant une solution de NaOH 2 M.

Les résultats obtenus pour chacune des fermentations effectuées sont présentés dans les paragraphes suivants. Pour chaque ensemencement, les courbes de croissance cellulaire de chaque condition sont présentées, ainsi que les graphiques d'évolution du pourcentage de viabilité, du pH, de la consommation du glucose, et de la quantité d'éthanol et d'acide acétique produite.

Tout d'abord, on présente l'évolution du pH pour les expériences réalisées (**figure 4.17**). Avec régulation, le pH oscille autour d'une valeur constante de 3.95 à 4.0 tout au long de la fermentation. En revanche, sans contrôle du pH on observe que dès le début de la culture le pH diminue rapidement jusqu'à une valeur d'environ 2.0 (vers 50 h.) à laquelle il reste jusqu'à la fin de la fermentation.

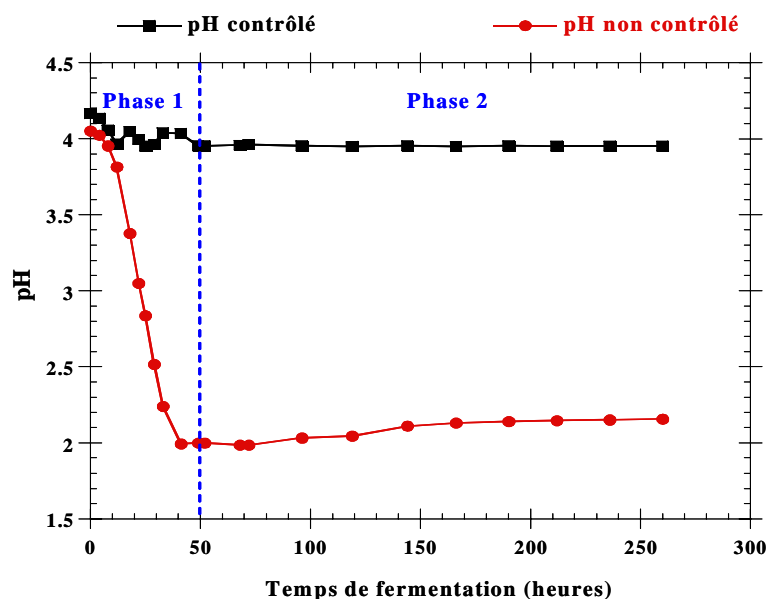


Figure 4.17. Evolution de la valeur du pH au cours de la culture de *B. bruxellensis* (B5d).

4.2.1. EFFET SUR LA CROISSANCE

La figure 4.18 A représente l'évolution de la biomasse lors des fermentations avec et sans régulation du pH. Les profils de biomasse sont similaires durant les phases actives de croissance, mais une différence de 10% est perceptible au niveau de la biomasse finale. En conditions de pH non régulé, le niveau de biomasse atteint est inférieur. Lorsque le pH est contrôlé, la biomasse maximale atteint 9 g/L, ce qui correspond à une population totale maximale de 872 millions de cellules/mL.

Il faut signaler que les vitesses spécifiques de croissance pour les deux conditions testées sont très similaires et que la valeur maximale observée (μ_{\max}) se situe autour de 0.22 h^{-1} .

Enfin, pour les deux conditions de pH étudiées, le plateau de biomasse maximale coïncide avec la consommation complète du substrat carboné (glucose = 0 aux 50 heures de fermentation) (**Figure 4.18 A et 4.19**).

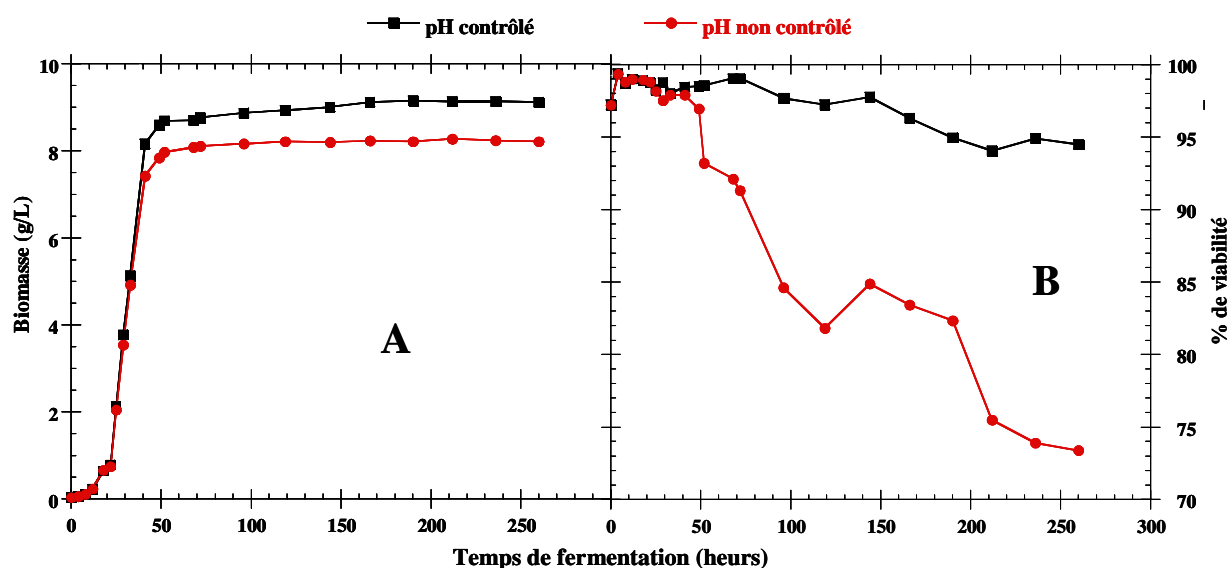


Figure 4.18. (A) profils de croissance et (B) pourcentage de viabilité aux différentes conditions de pH pour *Brettanomyces bruxellensis*.

Le suivi de la viabilité des populations (**Figure 4.18 B**) apporte des informations intéressantes sur l'influence du pH. On constate tout d'abord qu'avec régulation du pH *Brettanomyces* présente une mortalité quasiment nulle : la viabilité reste aux environs de 100% durant toute la phase de croissance active et est encore de 95% après 260 heures (phase de consommation de l'éthanol). Sans régulation du pH, la levure présente un comportement différent: durant la phase active de croissance le pourcentage de viabilité se situe autour de 95% mais une chute continue est enregistrée durant la consommation d'éthanol pour atteindre un taux de seulement 74%. On peut ici revenir sur les travaux menés par Aguilar et coll. (1999) qui ont montré que pour des fermentations réalisées à un pH de 2.0 l'activité métabolique de la levure était fortement perturbée à cause de l'acidité du milieu de culture et de la présence d'acide acétique formé au cours de la fermentation.

Ce point sera discuté plus loin (**Figure 4.17 et 4.20 B**).

4.2.2. EFFET SUR LA CONSOMMATION ET SUR LA PRODUCTION

Les courbes d'évolution de la concentration en glucose ainsi que les suivis de pH pour chaque fermentation réalisée sont présentées sur la **figure 4.19**. En ce qui concerne la consommation du sucre, on observe le même profil avec et sans régulation du pH. En effet, pour les deux fermentations le glucose a été consommé dans les 50 premières heures de culture avec la même vitesse de consommation. Ainsi, la variation du pH n'a pas affecté la consommation du sucre.

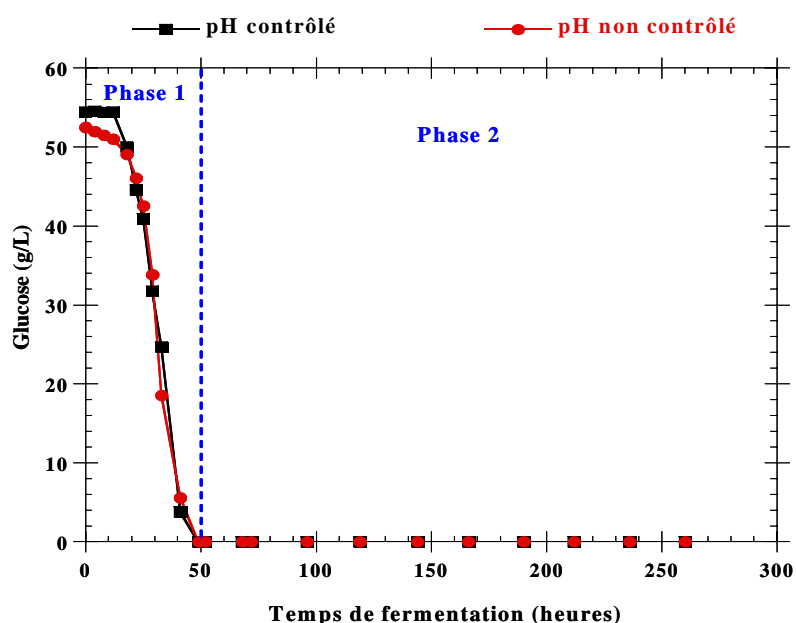


Figure 4.19. Profils de la consommation en glucose à différentes conditions de pH.

D'autre part, si on observe la **figure 4.20 A** on s'aperçoit que la production d'éthanol pour les fermentations réalisées est similaire. Avec et sans contrôle du pH on obtient le même profil cinétique (production et vitesse de production d'éthanol) lorsque le glucose est complètement consommé (50 heures de fermentation, phase 1). La concentration maximale d'éthanol atteint environ 20 g/L, ce qui correspond à un rendement de 0.38 g d'éthanol produit/g de glucose consommé.

Mais si nous comparons la consommation de l'éthanol (phase 2) dans les deux fermentations effectuées, on observe qu'avec régulation du pH la vitesse de consommation d'éthanol est plus importante, et donc la production d'acide acétique est plus rapide. Par exemple, quand le pH a été contrôlé nous avons observé une vitesse maximale de consommation d'éthanol de 0.14 g/L/h, tandis qu'à pH non contrôlé la

vitesse n'était que de 0.093 g/L/h soit un écart de 33%. On peut donc conclure qu'un contrôle du pH (dans la gamme étudiée) favorise la consommation d'éthanol.

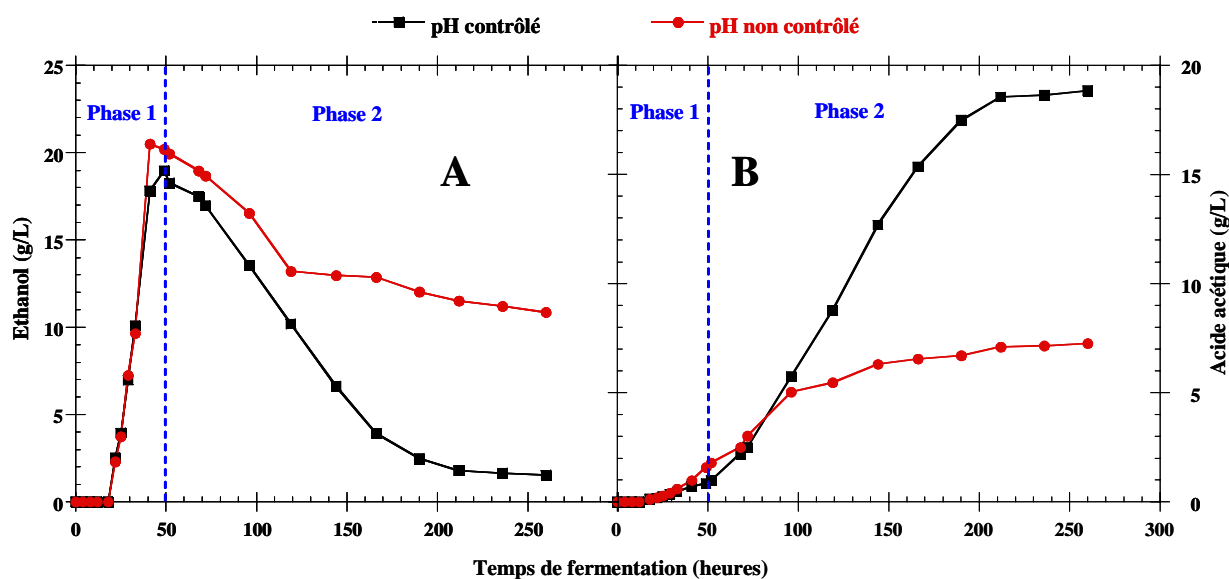


Figure 4.20. (A) profils de production d'éthanol, (B) profils de production d'acide acétique pour différentes conditions de pH pour *Brettanomyces bruxellensis*.

Les cultures réalisées nous offrent aussi la possibilité d'analyser la dynamique de l'effet du pH sur la production d'acide acétique, en deux phases.

Durant la première phase (consommation du glucose), la production d'acide acétique est faible (< 2 g/L) pour les deux fermentations étudiées. Ainsi, le pH n'affecte pas la production de cet acide faible. On peut donc imaginer qu'une faible acidité du milieu de culture (autour de 3.5) favorise l'activité fermentaire de la levure. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Aguilar et coll. (1999).

En revanche, lorsque l'éthanol est le substrat (phase 2) la production d'acide acétique est plus importante (> 5 g/L) dans les deux cas. Sur la **figure 4.20 B** nous pouvons constater que la régulation du pH a un effet très bénéfique sur *Brettanomyces bruxellensis* (B5d) pour produire de l'acide acétique. Le contrôle du pH induit une importante production de cet acide, on obtient une production de 18.8 g/L, tandis que sans régulation du pH la production est de 2.5 fois inférieure (7.3 g/L) et dans ces conditions on observe aussi un ralentissement de la vitesse de production d'acide acétique.

Ce phénomène peut être expliqué par les hypothèses suivantes:

1. Diminution du pourcentage de viabilité. En effet, avec moins de levures viables présentes dans le milieu de culture, moins d'acide acétique sera produit et il le sera moins rapidement.

Pour valider cette hypothèse nous avons calculé la vitesse spécifique (avec cellules viables) de production d'acide acétique pour les deux expériences testées. La **figure 4.21** montre que la diminution du pourcentage de viabilité à pH non contrôlé n'est pas liée à la diminution de la production d'acide acétique, puisque les valeurs des vitesses spécifiques sont différentes pour les essais réalisés. On peut alors penser qu'un phénomène autre que la quantité des levures viables dans la culture est impliqué pour expliquer l'effet du pH sur la production d'acide acétique.

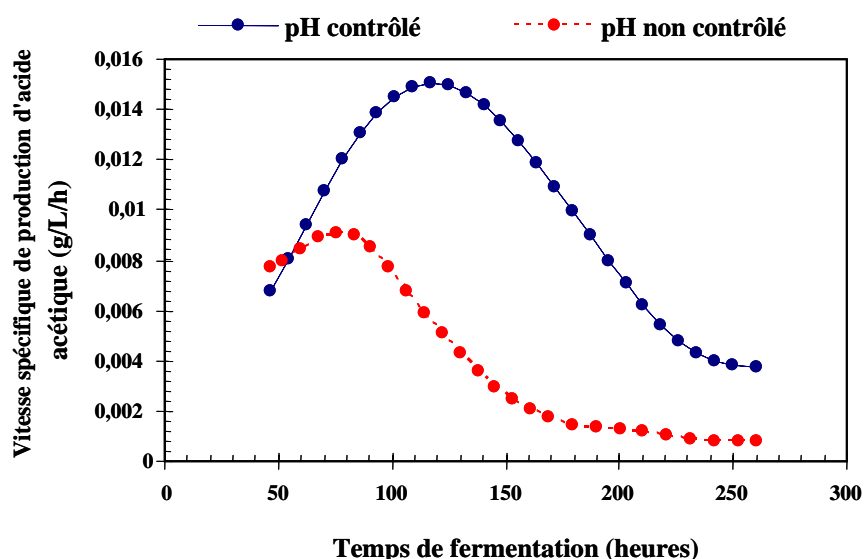


Figure 4.21. Vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du temps à pH contrôlé et non contrôlé.

2. Inhibition du système enzymatique du fait de la diminution du pH bloquant alors spécifiquement la réaction de production de l'acétique.
3. La quantité d'acide acétique toxique pour la cellule dans le milieu de culture qui augmente avec la diminution du pH (**Figure 4.18 B et 4.17 B**). Ceci sera discuté ensuite.

Ainsi, ces premières données expérimentales indiquent le rôle important joué par le pH sur l'activité de cette levure.

4.2.3. EFFET DU PH ET CONCENTRATION D'ACIDE ACETIQUE NON DISSOCIE DANS LA CULTURE

Nous venons de voir que la chute du pH avait pour effet d'inhiber la croissance de *Brettanomyces* et la production d'acide acétique. Pour mieux comprendre ce phénomène et au regard des études réalisées par Pampulha et Loureiro (1989) et par Taherzadelh et coll. (1997), on peut penser que l'effet négatif du pH est liée à la forme non dissociée de l'acide acétique produit au cours de la fermentation. Cette forme de l'acide acétique est reconnue comme toxique pour la cellule. Il semble en effet que l'acide acétique non dissocié puisse pénétrer à l'intérieur de la cellule, modifier son pH intracellulaire et ainsi endommager la cellule avec comme conséquence une perte de viabilité.

Nous avons donc déterminé la proportion d'acide acétique non dissocié et dissocié dans le milieu en utilisant l'équation de Handerson-Hasselbalch (équation 4.9).

$$pH = pK + \text{Log} \left(\frac{[A^-]}{[AH]} \right) \quad (4.9)$$

D'autre part

$$[At] = [A^-] + [AH] \quad (4.10)$$

Donc en substituant l'équation (4.10) dans l'équation (4.9)

$$[AH] = \left[\frac{[At]}{(1 + 10^{(pH-pK)})} \right] \quad (4.11)$$

où :

$[A^-]$ = forme dissociée (g/L)

$[AH]$ = forme non dissociée (g/L)

$[At]$ = concentration en acide acétique total (g/L)

pKa de l'acide acétique = 4.8

Le **tableau IV.5** récapitule la quantité d'acide sous la forme non dissociée ou dissociée pour les fermentations à pH contrôlé et non contrôlé. Comme on peut l'observer, la forme non dissociée toxique de l'acide acétique est la forme majoritairement présente pendant toute la fermentation pour tous les essais.

Mais on observe également qu'avec régulation de pH la forme non dissociée de cette acide est 2.3 fois plus importante que sans régulation de pH. Or à pH régulé aucune inhibition n'a été observée. L'effet inhibiteur du pH n'est donc pas lié à la quantité d'acide acétique non dissocié comme pouvait le prédire Pampulha et Loureiro (1989) ou Taherzadelh et coll. (1997).

Il semble qu'il faille donc se tourner vers d'autres hypothèses pour expliquer ce phénomène d'inhibition. L'inhibition se situe possiblement au niveau du blocage d'un système enzymatique par le pH rendant impossible la réaction de production d'acide acétique. Une étude plus spécifique à ce niveau pourrait alors constituer une perspective à ce travail.

Tableau IV.5. Concentration d'acide acétique dissocié et non dissocié ($[A^-]$, $[AH]$ et At au cours de la fermentation à différentes conditions de pH.

T (h)	pH contrôlé				pH non contrôlé			
	pH	At	A^-	AH	pH	At	A^-	AH
0	4.16	0	0	0	4.05	0	0	0
18	4.04	0.14	0.02	0.12	3.37	0.12	0.004	0.12
33	4.03	0.47	0.07	0.40	2.23	0.58	0.002	0.58
68	3.96	2.21	0.28	1.93	1.99	2.50	0.004	2.50
119	3.95	8.79	1.09	7.70	2.04	5.47	0.010	5.46
166	3.96	15.36	1.90	13.46	2.13	6.55	0.014	6.54
212	3.95	18.56	2.30	16.25	2.13	7.10	0.015	7.09
260	3.95	18.84	2.36	16.48	2.13	7.27	0.016	7.25

4.2.4. ANALYSE CINETIQUE

Cette étude est réalisée sur la première partie des fermentations, c'est-à-dire, sur l'étape de consommation du glucose. Le but de cette étude est de vérifier si la relation établie précédemment entre la vitesse de production de biomasse et la vitesse de synthèse des sous-produits de fermentation (éthanol et acide acétique) est validée dans les deux conditions de pH. Ainsi, comme pour l'étude menée sur l'influence de la température, le modèle Logistique (équation 3.1 chapitre 3) a été utilisé pour représenter l'évolution de la concentration en biomasse.

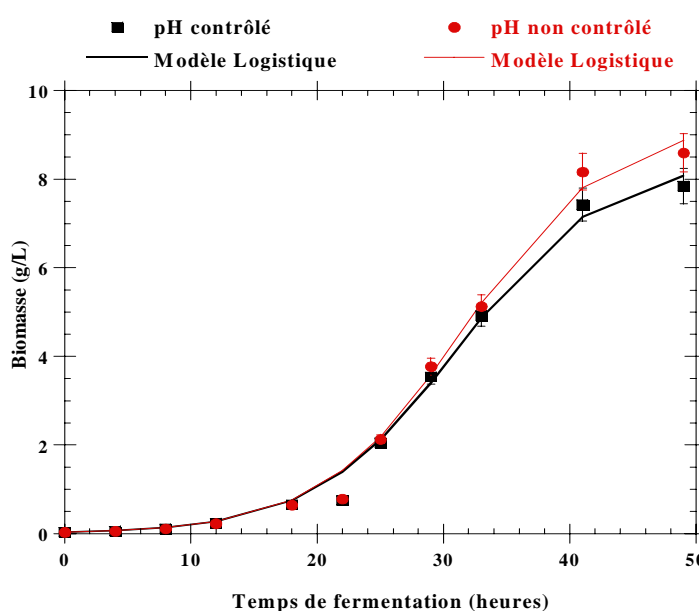


Figure 4.22 Représentation de la concentration de biomasse par le modèle Logistique pour différentes conditions de pH (souche *B. bruxellensis* B5d).

La **figure 4.22** montre la représentation de la concentration de biomasse par le modèle Logistique avec et sans régulation du pH. On peut noter une très bonne corrélation entre le modèle et les données expérimentales ($R^2=0.99$) pour les deux fermentations étudiées. De la même façon que pour l'effet de la température, nous avons analysé les relations qui existent entre les productions d'éthanol et d'acide acétique et la concentration en biomasse. Ces relations sont portées sur la **Figure 4.23**.

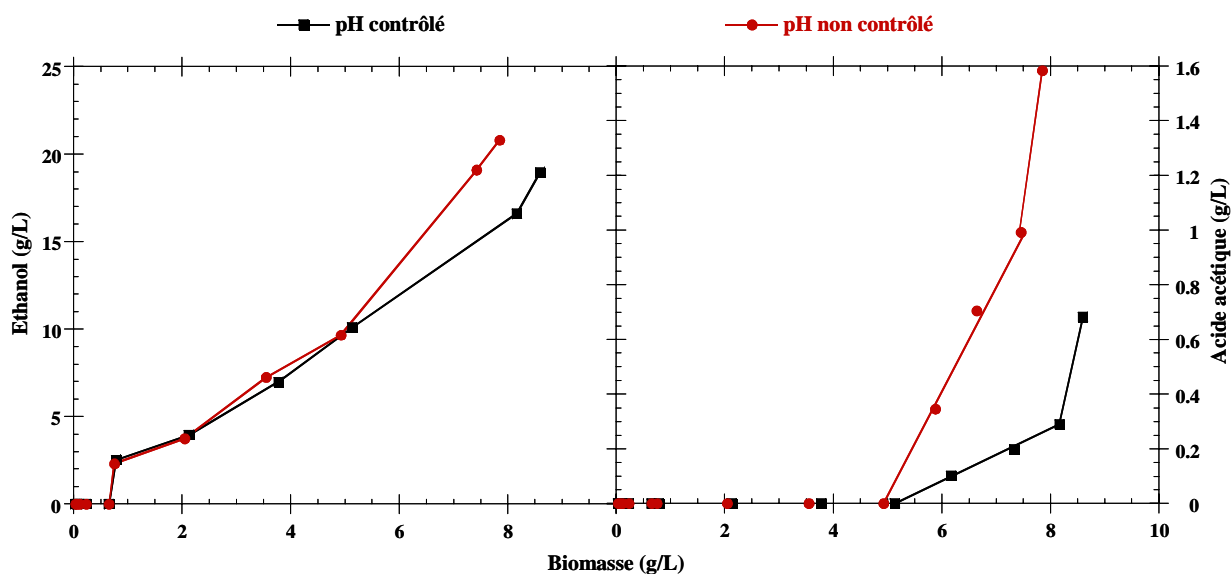


Figure 4.23. Concentrations d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en biomasse pour différentes conditions de pH (souche *B. bruxellensis* B5d).

Ces observations permettent de penser que le formalisme de Luedeking et Piret peut être utilisé. Comme le montrent les courbes portées sur la (Figure 4.24) le modèle est bien corrélé aux données expérimentales ($R^2 > 0.99$).

Ensuite, une analyse statistique (ANOVA) a été appliquée pour connaître l'effet de chaque paramètre sur les fermentations (pH contrôlé et pH non contrôlé). Les résultats de cette analyse montrent que les deux paramètres alpha et bêta sont significatifs (α et $\beta \neq 0$) pour les deux conditions testées. On retrouve alors les mêmes conclusions énoncées dans la partie sur l'étude de l'influence de la température à savoir que les vitesses de production et de croissance sont partiellement associées. L'explication de ce phénomène a été détaillée dans l'analyse cinétique de l'effet de la température section 4.1.4.

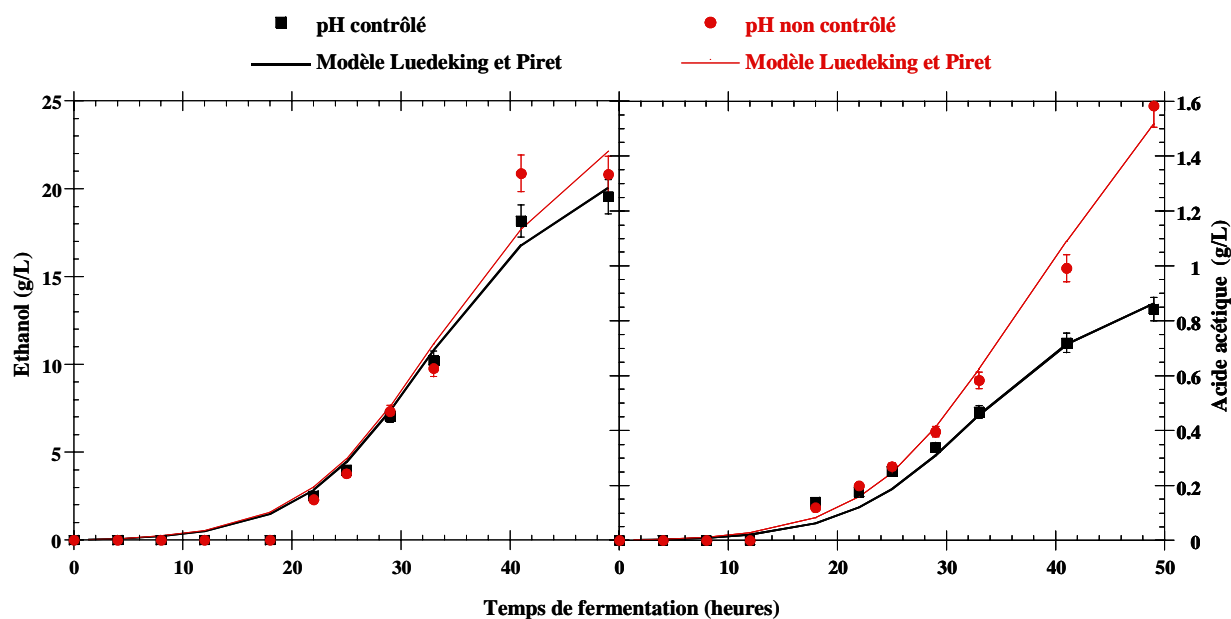


Figure 4.24. Représentation de la concentration d'éthanol et d'acide acétique par le modèle de Luedeking et Piret pour différentes conditions de pH. (*B. bruxellensis* B5d).

D'autre part, on observe sur le **tableau IV.6** que le paramètre alpha pour l'éthanol et/ou l'acide acétique est constant quelque soit la condition de pH étudié. Par contre, le terme bêta varie quand la fermentation est réalisée avec ou sans régulation du pH. Il est supérieur lorsque la fermentation s'effectue à pH non contrôlé, ce qui correspond à une production d'éthanol et d'acide acétique légèrement plus importante (**figure 4.20**).

Tableau IV.6 Valeurs des paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret pour différentes conditions de pH et ses coefficients de corrélation.

pH	Ethanol			Acétique		
	α	β	R^2	α	β	R^2
Contrôlé	$1.95 \pm 23.7\%$	$0.017 \pm 15.8\%$	0.99	$0.08 \pm 24\%$	$0.001 \pm 22.3\%$	0.99
Non contrôlé		$0.042 \pm 14\%$	0.98		$0.006 \pm 23.1\%$	0.99

4.2.5. Conclusions sur l'effet du pH

- On constate que la quantité de biomasse maximale est affectée lorsque le pH n'a pas été contrôlé. Lorsque la culture est réalisée sans contrôle du pH, nous avons noté une chute importante du pourcentage de viabilité, ainsi, on peut conclure que des valeurs de pH inférieures à 2.0 ont un effet négatif sur la croissance de *Brettanomyces*.
- Nous n'avons pas observé de différences dans les cinétiques de production d'éthanol et d'acide acétique pour les expériences réalisées lorsque la levure a utilisé le glucose comme source de carbone (phase 1). En effet, nous avons obtenu les mêmes profils de production de sous-produits de fermentation.
- Pour la consommation d'éthanol, nous avons montré que la régulation du pH a un effet positif sur la vitesse de consommation d'éthanol et sur la vitesse de production d'acide acétique.
- Pour l'ensemble de la fermentation (consommation du glucose et d'éthanol), la régulation du pH a un effet très bénéfique sur la production d'acide acétique. Nous avons obtenu 2.5 fois plus d'acide acétique lorsque la culture est réalisée avec contrôle du pH.
- L'acide acétique non dissociée est la forme majoritairement présente pendant toute la fermentation et pour tous les essais mais ce composé n'est pas la cause de l'effet inhibiteur du pH.
- Enfin, l'analyse cinétique nous a permis de démontrer que les réactions de production d'éthanol et d'acide acétique sont partiellement couplées à la réaction de croissance. Selon le formalisme de Luedeking et Piret on a montré que le paramètre associé à la croissance (α) est constant pour les deux conditions de pH testées et que β (lié à la population) varie en fonction du pH de la culture, β étant plus important lorsque la fermentation est réalisée sans contrôle du pH.

Chapitre V:

Etablissement d'un Schéma

Réactionnel pour le

Métabolisme du Glucose et de

l'éthanol Chez Brettanomyces

CHAPITRE 5. ETABLISSEMENT D'UN SCHEMA REACTIONNEL POUR LE METABOLISME DU GLUCOSE ET DE L'ETHANOL CHEZ *BRETTANOMYCES*

A partir de l'étude sur l'effet de la température et du pH (chapitre 4), nous avons emmagasiné de la connaissance sur les aspects métaboliques et cinétiques des deux souches de levure du genre *Brettanomyces* étudiées. Des modèles assez simplistes tels que la loi logistique ou le formalisme de Luedeking et Piret ont permis de représenter correctement les cinétiques de formation ou de consommation des constituants. Toutefois, si ces modèles permettent une description des phénomènes observés, ils ne permettent pas de dégager clairement les voies métaboliques actives. Dans ce dernier chapitre, nous allons tenter d'exploiter les informations collectées pour proposer un schéma réactionnel apparent d'utilisation du glucose et de l'éthanol par les levures *Brettanomyces*. La méthode de l'analyse factorielle proposée par Moreau en 2000 et présentée dans la partie bibliographie sera utilisée pour aboutir à l'écriture des stoechiométries des réactions et à leurs avancements.

Avant l'application de l'analyse factorielle, nous présenterons les résultats des bilans carbone réalisés afin de valider les résultats expérimentaux. Un bilan azote sera également présenté afin de vérifier que ce constituant n'est pas limitant pour la croissance.

5.1 Bilans matière

5.1.1 Calcul de la composition du gaz en sortie du fermenteur

Afin de tester la validité de nos mesures, nous avons réalisé un bilan molaire de carbone sur nos points expérimentaux: le glucose, la biomasse, l'éthanol, l'acide acétique et le dioxyde de carbone sont les produits carbonés considérés. Ces constituants sont soit dans la phase liquide (biomasse, glucose, acide acétique), soit dans la phase gazeuse (CO₂), soit dans les deux (éthanol). En effet, il est apparu que ne pas prendre en compte l'éthanol évaporé dans les bilans matière (comme c'est très souvent le cas en fermentation) entraînait des pertes finales de l'ordre de 10% en carbone. Nous avons donc décidé de calculer cette quantité puisque contrairement au CO₂ elle n'est pas mesurée expérimentalement.

Le calcul se fait avec l'hypothèse que la phase liquide et la phase gazeuse sont à l'équilibre thermodynamique. Dans ces conditions, nous pouvons écrire l'égalité des fugacités liquide et vapeur en éthanol, ce qui se traduit (avec l'hypothèse gaz parfait pour la vapeur) par l'équation 5.1:

$$\boxed{y = \gamma \cdot x \frac{P_o(T)}{P}} \quad (5.1)$$

où

y = est la fraction molaire d'éthanol dans la phase gazeuse

γ = est le coefficient d'activité de l'éthanol

x = est la fraction molaire de l'éthanol dans la phase liquide

P = est la pression atmosphérique (760 mm Hg)

$P_o(T)$ = est la pression de vapeur saturante à la température T .

Le coefficient d'activité de l'éthanol (γ) est calculé à partir de la loi de Margules dont les paramètres d'interactions binaires A_{12} et A_{21} sont tirés de la bibliographie (ouvrages de la Dechema).

$$\gamma = e^{(A_{12} / (1 + (A_{12} * x / (A_{21} * (1 - x)))))} \quad (5.2)$$

Où :

γ = est le coefficient d'activité de l'éthanol

x = est la fraction molaire de l'éthanol dans la phase liquide

A_{12} = paramètre d'interactions binaires (1.7392)

A_{21} = paramètre d'interactions binaires (0.9253)

La fraction molaire de l'éthanol dans la phase liquide (x) est déterminée à partir des différentes concentrations d'éthanol obtenu au cours de la fermentation. La pression de vapeur saturante (P_o) est calculée à partir de l'équation d'Antoine. Ainsi pour chaque point expérimental la concentration molaire en éthanol dans la phase vapeur est estimée. Connaissant par le calcul la composition en éthanol de la phase gazeuse il est alors possible de déterminer les pressions partielles de CO_2 , d'eau, d'éthanol et d' O_2 . Un bilan matière entre l'entrée et la sortie du fermenteur conduit à l'expression générale de

la vitesse de production en dioxyde de carbone (r_{CO_2}), de la vitesse de production en éthanol (r_{eta}) et aussi de consommation en oxygène (r_{O_2}) :

$$r_{CO_2} = \frac{Fn}{Vm} \left(\frac{P_{c,out}}{P - P_{w,out} - P_{o,out} - P_{c,out} - P_{eta,out}} - \frac{P_{c,in}}{P - P_{w,in} - P_{o,in} - P_{c,in} - P_{eta,in}} \right)$$

$$r_{O_2} = \frac{Fn}{Vm} \left(\frac{P_{o,in}}{P - P_{w,in} - P_{o,in} - P_{c,in} - P_{eta,in}} - \frac{P_{c,out}}{P - P_{w,out} - P_{o,out} - P_{c,out} - P_{eta,out}} \right)$$

$$r_{eta} = \frac{Fn}{Vm} \left(\frac{P_{eta,in}}{P - P_{w,in} - P_{o,in} - P_{c,in} - P_{eta,in}} - \frac{P_{eta,out}}{P - P_{w,out} - P_{o,out} - P_{c,out} - P_{eta,out}} \right)$$

Où :

- r_{O_2} : Vitesse de consommation de l'oxygène (mol/L/h)
- r_{CO_2} : Vitesse de production de CO_2 (mol/L/h)
- r_{eta} : Vitesse de production d'éthanol (mol/L/h)
- Fn : Débit molaire en azote (mol/h)
- Vm : Volume du milieu (L)
- P : Pression totale (atm)
- $P_{o,in}$: Pression partielle en O_2 dans le courant gazeux entrant (atm)
- $P_{c,in}$: Pression partielle en CO_2 dans le courant gazeux entrant (atm)
- $P_{eta,in}$: Pression partielle en éthanol dans le courant gazeux entrant (atm)
- $P_{w,in}$: Pression partielle en H_2O dans le courant gazeux entrant (atm)
- $P_{o,out}$: Pression partielle en O_2 dans le courant gazeux sortant (atm)
- $P_{c,out}$: Pression partielle en CO_2 dans le courant gazeux sortant (atm)
- $P_{c,out}$: Pression partielle en CO_2 dans le courant gazeux sortant (atm)
- $P_{eta,out}$: Pression partielle en éthanol dans le courant gazeux sortant (atm)
- $P_{w,out}$: Pression partielle en H_2O dans le courant gazeux sortant (atm)

Dans notre cas, ces expressions se simplifient de la façon suivante :

- La fermentation a lieu à 1 atmosphère: $P = 1$ atm
- L'air étant sec à l'entrée du fermenteur (D_E), le courant gazeux entrant ne contient pas d'eau, donc:

$$P_{w,in} = 0,00 \text{ atm}$$

- Entre le courant sortant du fermenteur et les analyseurs se trouve un dessiccateur donc le courant gazeux sortant (Fs) ne contient pas d'eau, donc:

$$P_{w,out} = 0,00 \text{ atm}$$

Donc :

$$r_{CO_2} = \frac{Fn}{Vm} \left(\frac{P_{c,out}}{1 - P_{o,out} - P_{c,out} - P_{eta,out}} - \frac{P_{c,in}}{1 - P_{o,in} - P_{c,in} - P_{eta,in}} \right)$$

$$r_{O_2} = \frac{Fn}{Vm} \left(\frac{P_{o,in}}{1 - P_{c,in} - P_{o,in} - P_{eta,in}} - \frac{P_{o,out}}{1 - P_{c,out} - P_{o,out} - P_{eta,out}} \right)$$

$$r_{eta} = \frac{Fn}{Vm} \left(\frac{P_{eta,out}}{1 - P_{o,out} - P_{c,out} - P_{eta,out}} - \frac{P_{eta,in}}{1 - P_{o,in} - P_{c,in} - P_{eta,in}} \right)$$

Vm est le volume molaire des gaz parfait à 20°C : Vm = 24.19 L/mol.

La consommation en oxygène et la production de dioxyde de carbone et d'éthanol sont calculées par intégration en utilisant la méthode d'EULER.

Afin de valider le calcul de l'évaporation de l'éthanol nous avons réalisé une expérience témoin avec une solution aqueuse d'éthanol à une concentration initiale de 22 g/L. Les conditions des essais ont été les suivantes: nous avons utilisé un réacteur «New Brunswick BioFlo III », en batch, avec un volume utile de 2 litres, à la température de 30°C. L'agitation a été fixée à 250 tours/min, aération=0.1 vvm (k_{La} = 4.9 h⁻¹). Nous avons mesuré la teneur en éthanol liquide par HPLC tout au long de la fermentation. Nous avons pu alors déduire l'éthanol évaporé puisque aucune réaction ne peut alors expliquer la disparition de celui-ci dans la phase liquide. Il est ainsi possible de comparer l'éthanol réellement évaporé et celui calculé par le modèle présenté précédemment.

Les résultats de la **figure 5.1** pour les deux duplicas réalisés montre une bonne corrélation entre les données expérimentales et les valeurs calculées. Une bonne reproductibilité des données expérimentales (> 95%) est également constatée. Nous

pouvons donc conclure que l'équation 5.1 est applicable pour réaliser le bilan carbone. Notons que les quantités évaporées sur 300h de fermentations sont assez importantes puisqu'elle représente environ 25% de l'éthanol initial et ce malgré un condenseur refroidi en tête de fermenteur par de l'eau de réseau à 15°C.

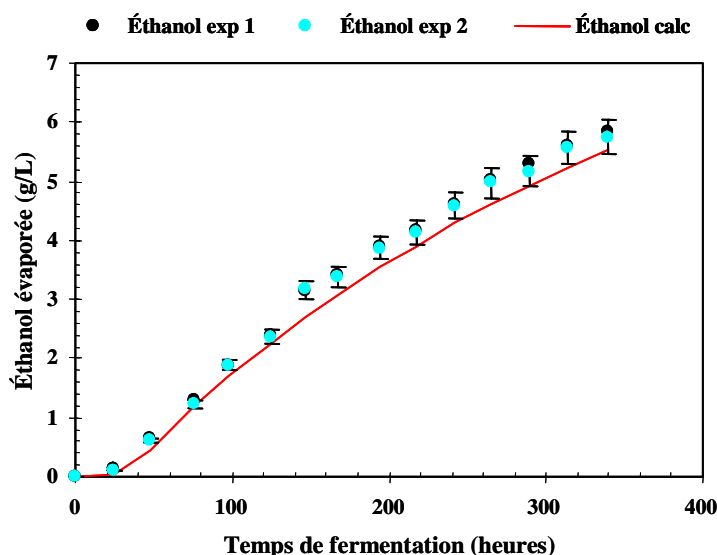


Figure 5.1. Comparaison de l'éthanol évaporé mesuré et calculé au cours du temps.

5.1.2. Bilan Carbone

Après avoir déterminé les concentrations molaires de carbone (CO_2 et éthanol) dans la phase gazeuse, pour pouvoir réaliser le bilan carbone, il est nécessaire de fixer une formule brute moyenne pour notre biomasse. Nous avons utilisé celle proposée par Aguilar (1998) pour notre souche *Brettanomyces bruxellensis* de distillerie B5d: $\text{CH}_{1.57}\text{O}_{0.83}\text{N}_{0.107}$. Nous avons considéré la même formule brute pour la souche B2. Deux exemples de bilan carbone instantané sont présentés sur la **figure 5.2** (A: 30°C souche B2; B: 30°C souche B5d pH contrôlé). Nous constatons qu'il boucle globalement bien, le pourcentage d'erreur n'excèdent jamais 5% tout au long des fermentations. Ceci signifie que nos mesures analytiques sont de qualité. Egalement, cela prouve que le glucose se transforme exclusivement en biomasse, éthanol, dioxyde de carbone et acide acétique. Aucun autre produit n'est formé.

Afin de valider toutes les fermentations, nous avons regroupé dans le **tableau V.1** les résultats obtenus sur le bilan carbone calculé pour chaque phase de la culture (phase 1: consommation du glucose et phase 2: consommation d'éthanol).

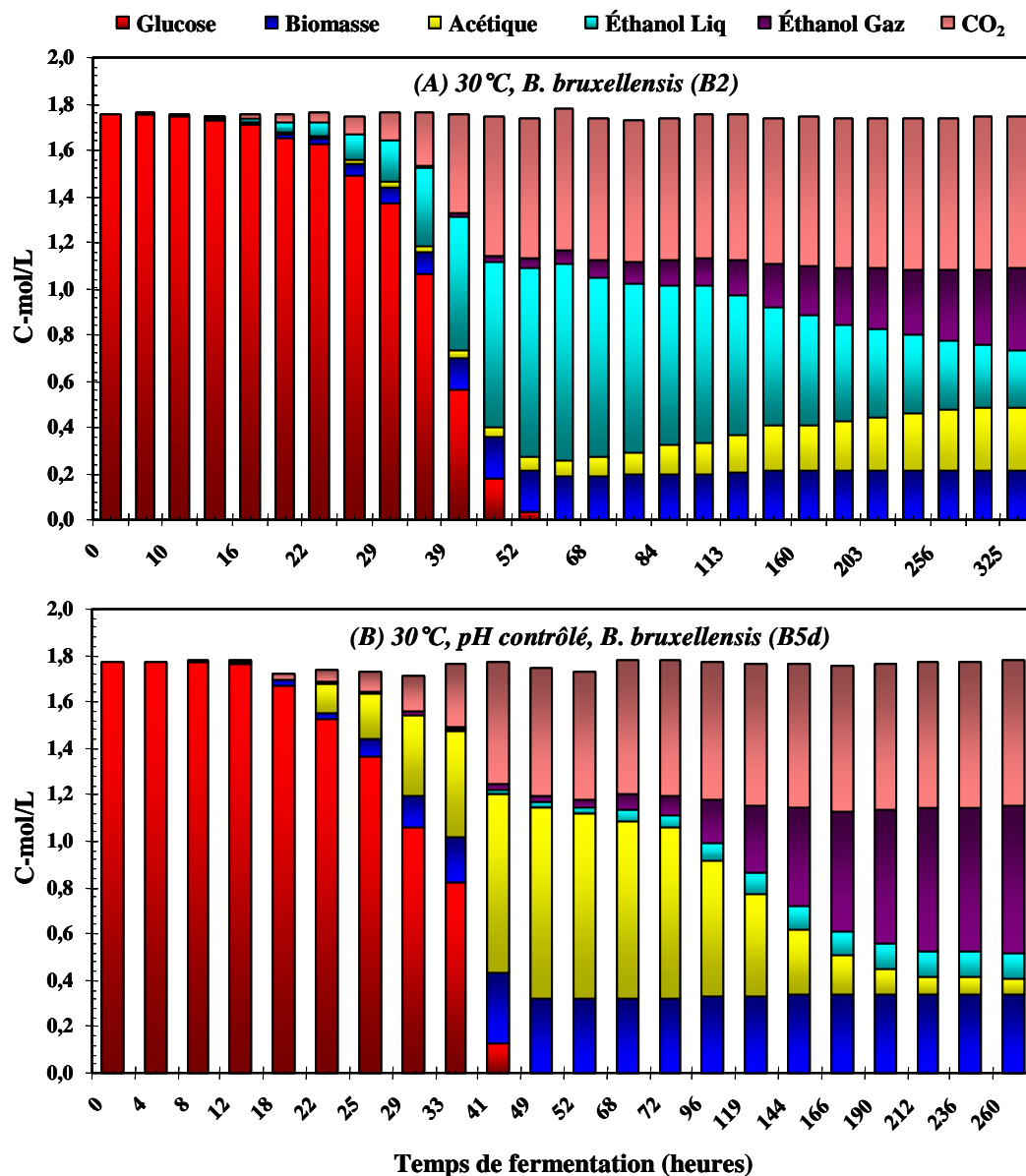


Figure 5.2. Bilan carbone instantané (A) souche *B. bruxellensis* (B2) à 30°C (B) souche *B. bruxellensis* (B5d) à 30°C, pH contrôlé.

Tableau V.1. Bilan carbone global pour les différentes conditions opératoires et les différentes souches.

Souche <i>B. bruxellensis</i> (B2) Effet de la température						
Phase	(1) Consommation du glucose			(2) Consommation d'éthanol		
Température	30°C	25°C	20°C	30°C	25°C	20°C
Entrée (C-mol/L)	1,75	1,68	1,82	0,25	0,21	0,09
Sortie (C-mol/L)	1,77	1,64	1,76	0,25	0,22	0,09
% erreur	1,17	2,42	3,38	2,59	2,93	1,11
Souche <i>B. bruxellensis</i> (B5d) Effet du pH						
Phase	(1) Consommation du glucose			(2) Consommation d'éthanol		
pH	Contrôlé	Non contrôlé		Contrôlé	Non contrôlé	
Entrée (C-mol/L)	1,69	1,75		0,67	0,21	
Sortie (C-mol/L)	1,65	1,78		0,68	0,21	
% erreur	2,59	1,64		2,07	2,59	

D'autre part, et après avoir validé nos résultats par le bilan molaire de carbone, nous voulons connaître la relation molaire qui existe entre la consommation d'éthanol et la production d'acide acétique pendant la phase 2 de la fermentation (consommation d'éthanol et glucose= 0). Cette estimation a été réalisée pour l'étude de l'effet du pH. La figure ci-dessous montre les résultats obtenus (**Figure 5.3**).

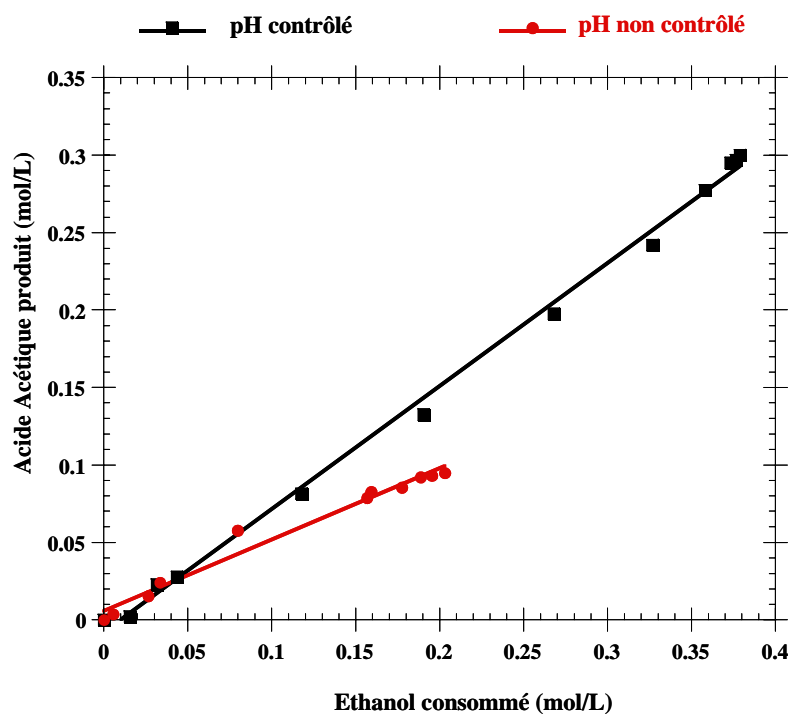


Figure 5.3. Relation entre la consommation d'éthanol et la production d'acide acétique à différentes conditions de pH (*B. bruxellensis* B5d).

En regardant cette figure on remarque qu'il existe en effet une relation molaire linéaire entre la consommation d'éthanol et l'acide acétique pour les deux conditions de pH et jusqu'à la fin de la fermentation (avec coefficients de corrélation > 0.98). Néanmoins, on remarque, qu'à pH contrôlé le rapport d'acide acétique produit/éthanol consommé est plus important qu'à pH non contrôlé (0.79 contre 0.46). Ainsi la régulation du pH exerce un effet positif sur la production de cet acide organique faible. Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisé par Freer et coll., (2003) sur la production d'acide acétique à pH constant par les levures du genre *Brettanomyces/Dekkera*.

5.1.3. Bilan azote

Comme nous l'avons fait pour le carbone, le bilan azote a été réalisé. Les constituants contenant de l'azote sont à priori très restreints : le sulfate d'ammonium, l'extrait de levure et la biomasse. Les deux premiers sont des substrats et le dernier un produit. Le but est ici de vérifier la cohérence des données expérimentales mais aussi de vérifier que l'azote n'est pas limitant pour la croissance ce qui pourrait fausser nos interprétations sur le métabolisme du glucose.

Les profils de consommation d'azote assimilable ont été réalisés pour les fermentations à pH contrôlé et non contrôlé. Les dosages ont été faits à partir des kits enzymatiques présentés dans la section 2.4.6 matériels et méthodes.

La consommation d'azote assimilable (azote ammoniacal + azote α -aminé) se fait selon des vitesses similaires pour les deux conditions (**figure 5.4**).

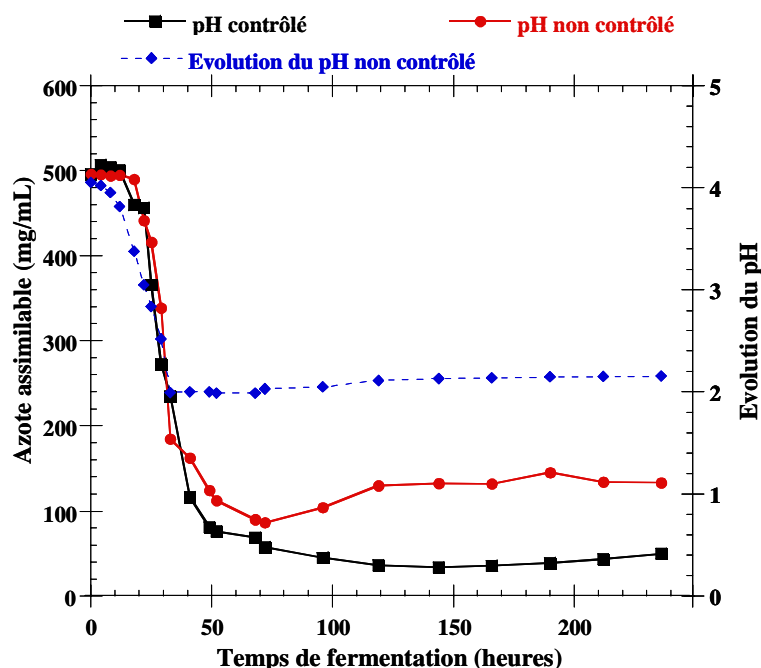


Figure 5.4. Evolution de la consommation d'azote assimilable au cours de la fermentation à différentes conditions de pH en *B. bruxellensis* (B5d).

D'après ces observations (**Figure 5.4**) nous pouvons conclure que la concentration d'azote n'est pas un composant limitant pour la croissance de *Brettanomyces* puisque de l'azote assimilable résiduel est présent dans les deux cas.

D'autre part, nous avons pu vérifier que l'azote consommé dans le milieu correspond bien à l'azote utilisé pour la production de biomasse. Expérimentalement, la consommation finale d'azote assimilable atteint 469 mg/L et 418 mg/L à pH régulé et à pH non régulé. Pour ces deux mêmes fermentations, la quantité d'azote utilisée pour la production de biomasse est de 475 mg/L et 422 mg/L (valeurs calculées à partir de la formule brute de biomasse $\text{CH}_{1.57} \text{O}_{0.83} \text{N}_{0.107}$). Les valeurs d'azote assimilable

consommées sont donc parfaitement équivalentes à l'azote retrouvé dans la biomasse ce qui prouve la cohérence de nos données expérimentales.

Par ailleurs, les travaux de Won et coll., (1993) et Castrillo et coll., (1995) qui ont mis en évidence une chute du pH lors de l'assimilation d'ions d'ammonium par des levures *Saccharomyces cerevisiae*, semblent également s'appliquer ici pour les levures *Brettanomyces*. En effet, pour l'expérimentation à pH non contrôlé, la cinétique d'assimilation d'azote est totalement corrélée à la chute du pH. Nous n'approfondirons pas plus ce phénomène, une thèse est en cours de réalisation dans notre laboratoire sur ce thème.

5.2. Proposition du schéma réactionnel

Les bilans de carbone et azote ayant montré la cohérence de nos mesures, il est maintenant possible d'utiliser notre base de données expérimentales pour proposer un schéma réactionnel par la méthode de l'analyse factorielle.

5.2.1. Méthode appliquée pour déterminer le schéma réactionnel

Dans notre cas, nous allons utiliser comme méthode celle décrite par Moreau (2000) (étude bibliographique). Rappelons quelques principes établis par cet auteur:

- La relation matricielle est: $D = Y N$

Avec Y la matrice des avancements de réaction, N la matrice des stoechiométries et D la matrice des rétentions molaires.

- **Le schéma métabolique doit être imposé et seuls les coefficients stoechiométriques et les avancements de réactions sont recherchés.**
- La résolution du problème est une optimisation sous contraintes qui consiste à minimiser les différences entre la matrice D expérimentale (D_{exp}) et la matrice D théorique (D_{calc}) calculée à partir de la matrice Y des avancements de réaction et de la matrice N des stoechiométries proposées. Le critère choisi pour la minimisation des écarts entre D_{exp} et D_{calc} est la somme des erreurs absolues au carré pondérée par la mesure maximale de chaque constituant considéré. (équation ci-dessous)

$$\|D_{\text{exp}} - D_{\text{calc}}\| = \sum_i \frac{\sqrt{\sum_j (D_{i,j,\text{exp}} - D_{i,j,\text{calc}})^2}}{\text{Max}(|D_{i,j,\text{exp}}|)}$$

- Les contraintes sont :
 - Les avancements de réaction sont tous positifs ainsi que leurs dérivées par rapport au temps.
 - La matrice des stoechiométries respecte les bilans élémentaires.

La méthode appliquée pour déterminer le schéma réactionnel est schématisée par la **figure 5.5**. On observe sur cette figure les différentes étapes à suivre.

Tout d'abord, la méthode impose la proposition d'un schéma réactionnel. Nous devons donc établir les différentes réactions supposées impliquées dans le métabolisme de *Brettanomyces*. Pour cette étape la connaissance théorique est primordiale. Ensuite, l'établissement de ces réactions permet d'établir deux matrices : la **matrice des coefficients stœchiométriques (matrice N)** pour chaque réaction proposée et la **matrice des avancements de réactions (matrice Y)** au cours du temps. A partir de ces deux matrices nous allons calculer la **matrice de données théoriques ($D_{\text{calc}} = Y \cdot N$)**. Des valeurs d'initialisation aux deux matrices Y et N sont donc nécessaires.

D'autre part, à partir des **résultats expérimentaux** obtenus dans la première partie de cette étude (chapitre 4: effet de la température et du pH), nous construisons la matrice expérimentale des rétentions molaires (D_{exp}). La résolution du problème se fait ensuite en **minimisant** la différence entre la matrice des données expérimentales (D_{exp}) et la matrice théorique (D_{calc}) en jouant sur les valeurs des matrices Y et N.

Nous vérifions alors l'adéquation des données expérimentales avec les données simulées. Si la corrélation est bonne, le **schéma réactionnel proposé est validé**. En revanche, s'il n'existe pas une bonne adéquation entre les données expérimentales et les données calculées, cela signifie que le schéma réactionnel proposé est incorrect. Il est alors nécessaire de faire une nouvelle proposition et de réitérer la démarche d'optimisation.

Il existe essentiellement deux points critiques pour l'application de cette méthode:

(1) Le premier concerne la proposition du schéma réactionnel. Pour ce point, la connaissance théorique du système étudié est primordiale. Il s'agit de traduire en un schéma réactionnel apparent qui ne fait intervenir que des composés mesurés toute la connaissance théorique du métabolisme de la levure. Cette étape de simplification est délicate et nécessite un soin tout particulier.

(2) Le second point critique concerne la résolution du problème d'optimisation. Les variables d'optimisation sont les coefficients stoechiométriques et les avancements de réactions. Pour des systèmes complexes, avec de nombreuses réactions, le nombre de ces variables peut devenir rapidement important alors que les données expérimentales restent en général en nombre limité. La résolution numérique est alors parfois difficile car la sensibilité à certaines variables est faible. Afin de faciliter la résolution du problème d'optimisation, l'utilisateur doit fournir le maximum d'informations sur les valeurs des variables ou sur les relations existantes entre elles. Dans la méthode de Moreau (2000), il s'agit de respecter les bilans élémentaires pour les coefficients stoechiométriques et d'imposer des avancements de réactions positifs et croissants. Nous allons voir que pour notre problème, tout le travail préliminaire d'analyse cinétique, avec notamment le formalisme de Luedeking et Piret, va être utilisé pour diminuer le nombre d'inconnues et ainsi faciliter la résolution du problème d'optimisation.

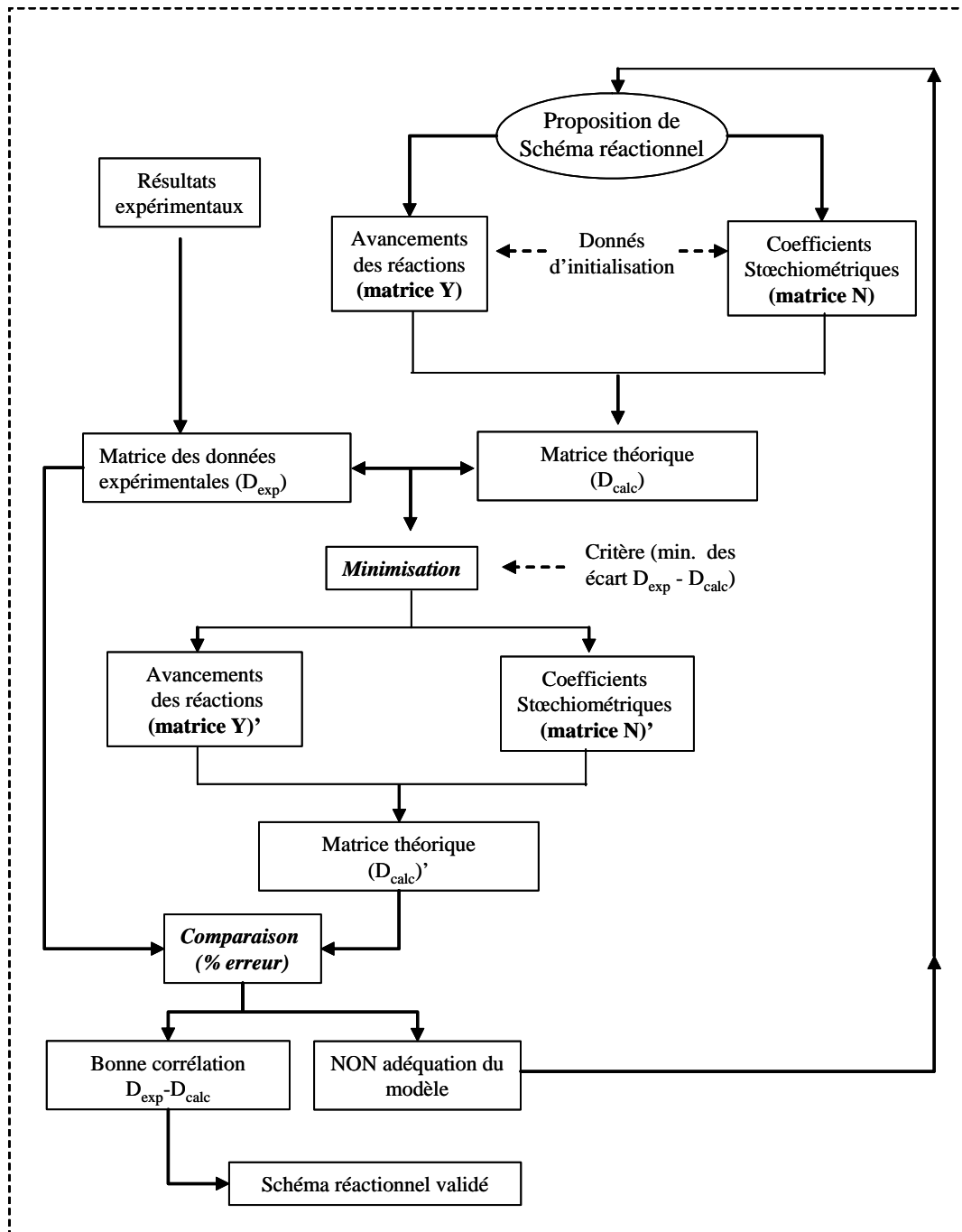


Figure 5.5. Représentation de la méthode utilisée pour établir le schéma réactionnel.

5.2.2. Proposition d'un schéma réactionnel

La méthode présentée a été utilisée pour déterminer le schéma réactionnel des deux phases distinctes du métabolisme de *Brettanomyces*, à savoir:

- ⇒ phase 1 consommation du glucose,
- ⇒ phase 2 consommation de l'éthanol.

Les substrats principaux sont donc le glucose et l'éthanol. Ce sont les constituants considérés comme «clés», ceux dont le coefficient stoechiométrique dans le schéma réactionnel proposé est fixé à -1.

(1) Consommation du glucose :

Le schéma réactionnel suggéré pour la consommation du glucose est basé sur les résultats obtenus dans la partie «**analyse cinétique des fermentations**». Nous rappelons ici les conclusions établies :

- A partir de l'analyse statistique ANOVA nous avons montré que les paramètres alpha et bêta du modèle de Luedeking et Piret sont significatifs. Il existe ainsi une relation partielle entre la vitesse de croissance et la vitesse de production d'éthanol et d'acide acétique.
- Suite à ce résultat nous avons observé que la valeur d'alpha était constante quelles que soient les températures et les valeurs de pH. D'après le formalisme de Luedeking et Piret, le paramètre alpha est lié à la production de biomasse. Ainsi, avoir une valeur de alpha constante indique qu'une même réaction avec une cinétique unique produit de la biomasse, de l'éthanol et de l'acide acétique.
- L'analyse statistique a par contre donnée des valeurs de bêta (lié à la population et non plus à la croissance) différentes pour l'éthanol et l'acide acétique pour chaque température et chaque condition de pH. Cela suggère que des réactions différentes (et donc des cinétiques différentes) sont impliquées dans la production d'éthanol et d'acide acétique et que cette fois ces réactions ne sont pas liées à la croissance de la levure. Nous aurons alors une réaction pour la production d'éthanol et une réaction pour la production d'acide acétique à partir de glucose comme source de carbone. Ces deux réactions sont distinctes car nous avons montré qu'il n'y avait pas de lien entre la cinétique de production d'éthanol et d'acide acétique.
- D'autre part, avec le bilan molaire de carbone, nous avons mis en évidence l'existence d'évaporation d'éthanol qui doit être représentée dans le schéma réactionnel par une réaction à part entière.

En partant de ces analyses, le schéma réactionnel pour la consommation de glucose (phase 1) est le suivant (**Figure 5.6**):

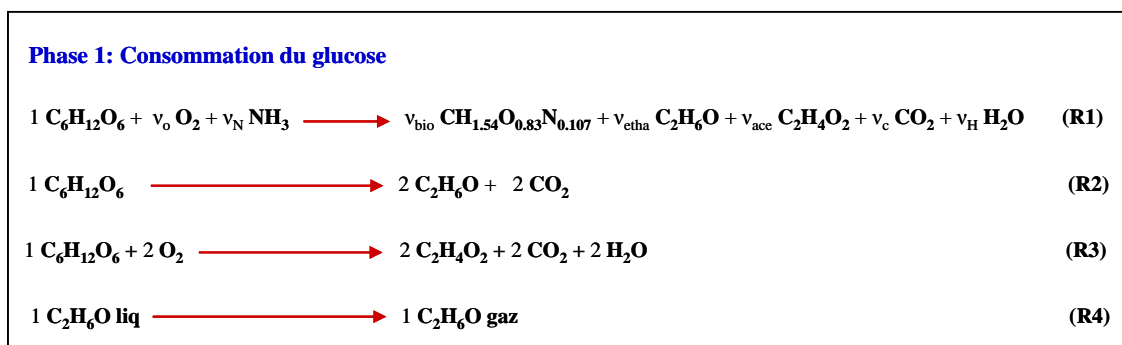


Figure 5.6. Schéma réactionnel suivi par *B. bruxellensis* pour la consommation du glucose (phase 1).

Le schéma réactionnel proposé suppose que l'éthanol et l'acide acétique peuvent être produits selon deux voies différentes, une liée à la biomasse, l'autre non.

Si nous confrontons ce schéma réactionnel aux connaissances du métabolisme du glucose chez les levures (**figure 5.7**), cela semble surprenant puisqu'il n'existe qu'une voie connue de production de l'acide acétique et de l'éthanol, celle provenant de l'acétaldéhyde qui n'est pas couplée à la production de biomasse.

En fait l'explication pourrait être la suivante:

Le glucose chez les levures est tout d'abord transformé en pyruvate. Celui-ci peut être en partie intégré au cycle de Krebs pour produire de la biomasse et en partie décarboxylé en acétaldéhyde. L'acétaldéhyde est alors transformé par deux voies enzymatiques différentes soit en acide acétique, soit en éthanol.

Lorsqu'une cellule est en phase de reproduction, le rapport des flux du pyruvate vers le cycle de Krebs et vers l'acétaldéhyde est alors constant quelles que soient les conditions environnementales (température et pH). Donc globalement, les quantités produites de biomasse et d'éthanol et acide acétique sont liées par une même cinétique.

Lorsque la cellule n'est plus en phase de reproduction, elle modifie ce rapport de flux au profit de la production d'acétaldéhyde. Elle produit alors de l'éthanol et de l'acide acétique mais plus de biomasse.

En fait le schéma réactionnel proposé traduit la différence d'état physiologique au sein de la population des levures, certaines cellules étant en phase de reproduction, d'autres en phase stationnaire. Comme nous représentons la biomasse de façon globale et homogène, nous représentons ces différences dans notre schéma réactionnel par des réactions compétitives vis-à-vis du glucose. En fait elles ne le sont pas pour une cellule donnée mais pour une population totale, la compétition étant entre les individus qui utilisent le glucose différemment.

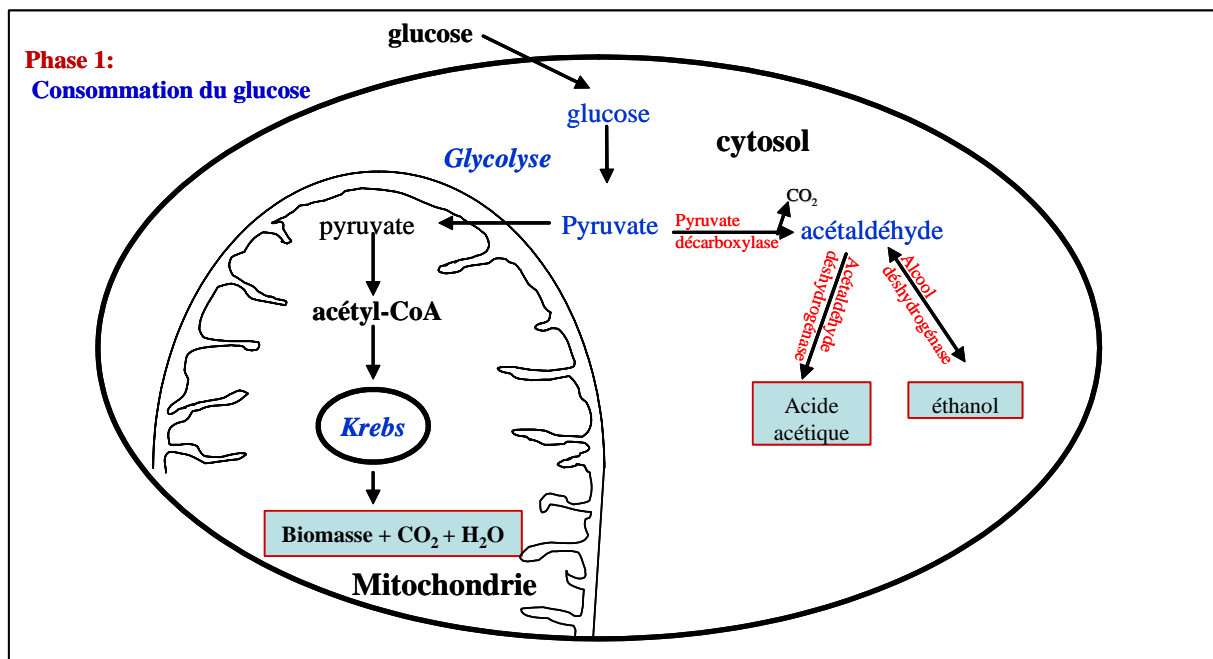


Figure 5.7. Métabolisme suivi par *B. bruxellensis* pour la consommation du glucose (phase 1).

(2) Consommation d'éthanol :

Pour la phase de consommation de l'éthanol, nous retrouvons toujours la réaction d'évaporation d'éthanol (R4). Nous avons également établi lors de l'analyse cinétique de cette phase que de la biomasse était produite à partir de ce substrat. Nous en avons donc déduit la réaction R5. Enfin, nous avons également mis en évidence le lien entre consommation d'éthanol et production d'acide acétique, ceci s'accompagnant de consommation d'oxygène. La réaction R6 est ainsi proposée. Le schéma réactionnel pour cette seconde phase est donc le suivant (**figure 5.8**).

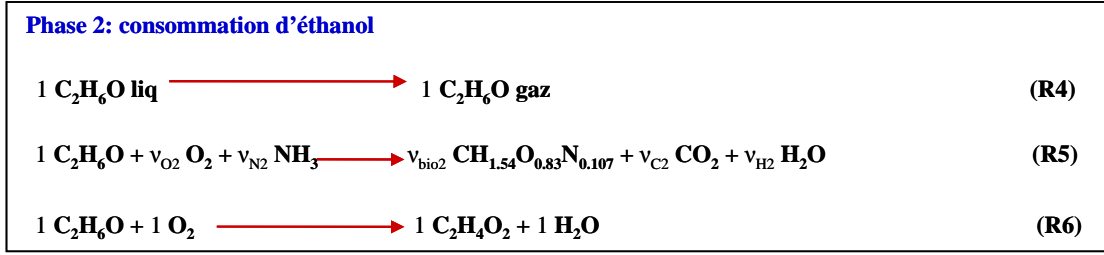
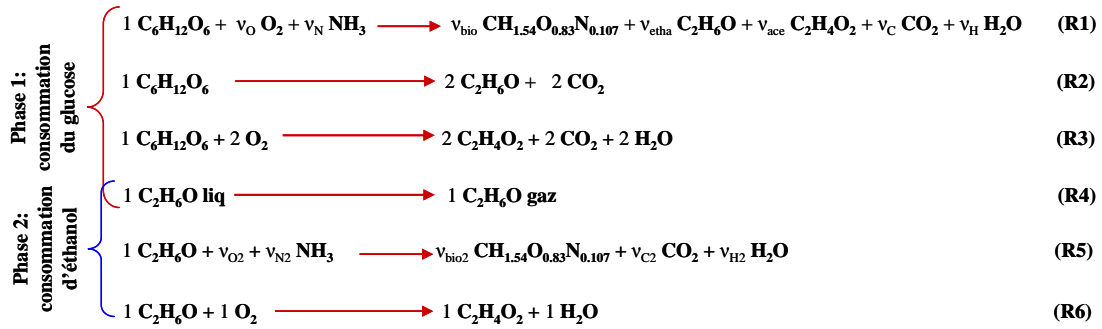


Figure 5.8. Schéma réactionnel suivi par *Brettanomyces* pour la consommation d'éthanol (phase 2).

Il est important de remarquer qu'il s'agit du même schéma réactionnel proposé pour les deux souches étudiées (B5d et B2).

5.2.3. Formulation du problème de minimisation et stratégie de résolution

Le schéma réactionnel proposé et rappelé ci-dessous est testé par la méthode de l'analyse factorielle.



Où v_{N} v_{O} v_{C} v_{H} v_{bio} v_{etha} $v_{\text{acé}}$ (phase 1) et v_{N_2} v_{O_2} v_{C_2} v_{H_2} v_{bio2} (phase 2) sont respectivement les coefficients stœchiométriques d'azote, du carbone, de l'hydrogène, de la biomasse, de l'éthanol et de l'acide acétique.

Dans les équations stoechiométriques établies pour les deux phases, seuls les coefficients stoechiométriques des réactions de production de biomasse à partir de glucose (R1) et d'éthanol (R5) sont inconnus. Nous avons donc 7 inconnues (v_{N} v_{O} v_{C} v_{H} v_{bio} v_{etha} $v_{\text{acé}}$) pour la réaction 1 et 5 inconnues (v_{N_2} v_{O_2} v_{C_2} v_{H_2} v_{bio2}) pour la réaction 2. Nous pouvons écrire les 4 bilans sur les éléments atomiques (C, H, O et N) pour chacune des réactions ce qui permet de diminuer le nombre d'inconnues à 3 (v_{bio} v_{etha} $v_{\text{acé}}$) pour R1 et 1 (v_{bio}) pour R2.

Afin de réduire encore le nombre de coefficients stoechiométriques inconnues, nous avons exploité les valeurs $\alpha_{\text{étha}}$ et $\alpha_{\text{acé}}$ identifiées lors de l'analyse cinétique. D'après le modèle de Luedeking et Piret, ces valeurs correspondent en fait au rapport qui existe entre les coefficients stoechiométriques de la biomasse et de l'éthanol pour v_{etha} et de l'acide acétique pour $v_{\text{acé}}$. Nous avons donc: $v_{\text{eth}} = v_{\text{bio}} * \alpha_{\text{etha}}$ et $v_{\text{ace}} = v_{\text{bio}} * \alpha_{\text{ace}}$ pour les deux souches. Nous rappelons que α_{etha} identifié dans le chapitre 4 était identique pour toutes les manipulations alors que $\alpha_{\text{acé}}$ était différent entre les manipulations à température constante et celle à pH contrôlé. En fait, l'aération était différente entre les deux, les fermenteurs étant différents.

Au final, seuls deux coefficients stoechiométriques sont à identifier : v_{bio1} et v_{bio2} .

En ce qui concerne les **avancements de réactions**, ils sont à priori inconnus pour les 6 réactions. Là encore, nous allons exploiter l'analyse cinétique faite dans la première partie pour réduire le nombre de ces inconnues.

Pour les réactions R2 et R3, les valeurs de β_{etha} et $\beta_{\text{acé}}$ identifiées pour chaque réaction avec le modèle de Luedeking et Piret permettent de déduire les advancements de chacune de ces deux réactions pour chaque expérience. En effet, β_{etha} correspond au terme cinétique de production de l'éthanol et de l'acide acétique qui n'est pas lié à la biomasse, donc à R2 et R3. De même, les advancements de la réaction 4 sont connus grâce au modèle présenté dans la partie 5.1. Ils ne font donc pas partie des variables d'optimisation.

Au final, nous n'avons donc plus que les advancements des réactions R1, R5 et R6 qui constituent des variables d'optimisation.

L'analyse cinétique préliminaire réalisée au chapitre 4 nous a donc permis de diminuer très considérablement le nombre de variables pour la résolution du problème d'optimisation puisque nous sommes passées de 4 coefficients stoechiométriques et 6 advancements de réactions à 2 coefficients stoechiométriques et 3 advancements. Ceci facilite la tâche numérique de résolution. Le simple solveur du logiciel Excel a pu ainsi être utilisé.

Pour la résolution de ce problème nous disposons de:

- ⇒ 6 expériences à différentes températures sur la souche distillerie,
- ⇒ 3 expériences à différentes températures sur la souche vin,
- ⇒ 2 expériences à différents pH sur la souche distillerie.

La stratégie de résolution a consisté à déterminer tout d'abord les 2 coefficients stoechiométriques inconnues expériences par expériences. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant:

Tableau V.2. Récapitulatif des coefficients stœchiométriques obtenus pour chaque série d'expériences.

Souche <i>B. bruxellensis</i> distillerie (B5d): effet de la température Consommation du glucose (phase 1)	Coefficients Stœchiométries	Réaction 1					
	Température	35°C	32°C	30°C	25°C	20°C	15°C
	Biomasse	1.29	1.21	1.22	1.20	1.19	1.32
	Critère	0.0003	0.017	0.012	0.006	0.028	0.007
Souche <i>B. bruxellensis</i> vin (B2): effet de la température Consommation du glucose (phase 1) et de consommation de l'éthanol (phase 2)	Coefficients Stœchiométries	Réaction 1			Réaction 5		
	Phase	Consommation du glucose (phase 1)			Consommation d'éthanol (phase 2)		
	Température	30°C	25°C	20°C	30°C	25°C	20°C
	Biomasse	1.14	1.18	1.16	0.85	0.89	0.86
	Critère	0.057	0.036	0.012	0.009	0.001	0.001
Souche <i>B. bruxellensis</i> distillerie (B5d): effet du pH Consommation du glucose (phase 1) et de consommation de l'éthanol (phase 2)	Coefficients Stœchiométries	Réaction 1		Réaction 5			
	Phase	Consommation du glucose (phase 1)		Consommation d'éthanol (phase 2)			
	pH	Contrôlé	Non contrôlé	Contrôlé	Non contrôlé		
	Biomasse	1.23	1.25	0.75	0.86		
	Critère	0.027	0.027	0.018	0.003		

L'identification expérience par expérience montre que les coefficients sont proches pour une même souche mais diffèrent entre les deux souches testées. Au vu de ces résultats, il a été choisi d'identifier les 2 coefficients stoechiométriques inconnus en regroupant l'ensemble des expériences pour une même souche. Les résultats sont donnés ci-dessous, le critère correspondant à l'écart entre valeurs mesurées et valeurs calculées pour l'ensemble des expériences.

Schéma réactionnel global pour la souche *B. bruxellensis* distillerie (B5d):

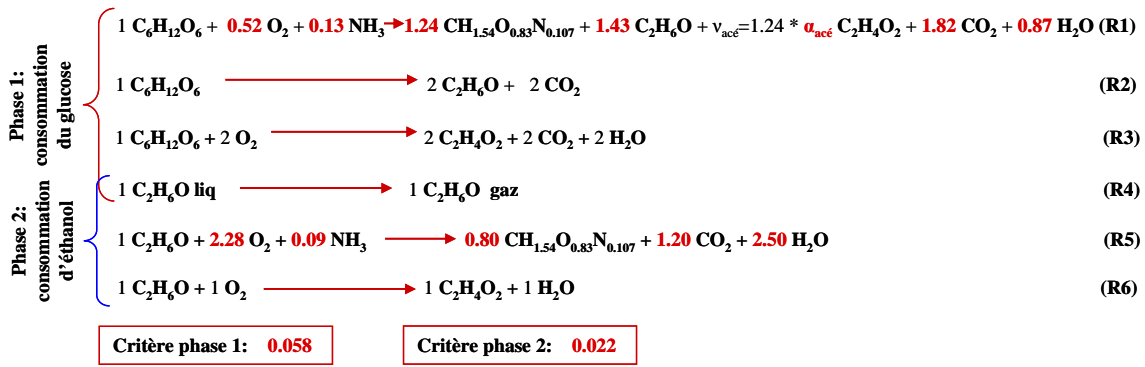
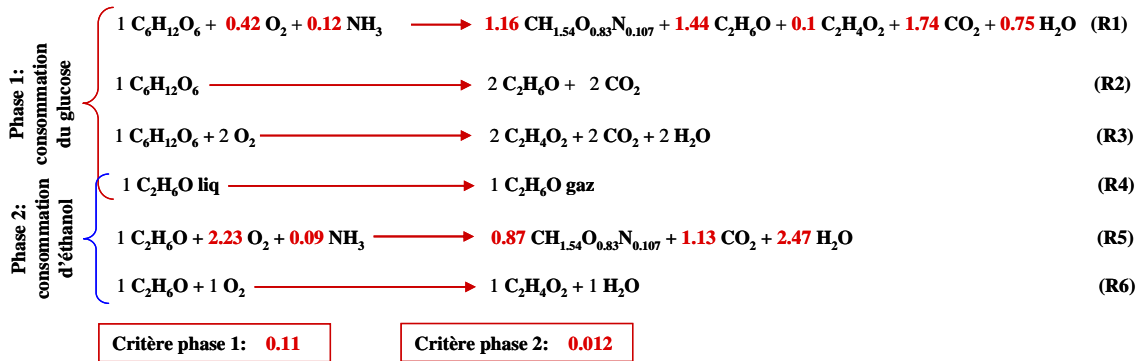


Schéma réactionnel global pour la souche *B. bruxellensis* vin (B2):



Nous avons donc un schéma réactionnel unique quelles que soient les conditions environnementales (température et pH). Par contre, les coefficients stoechiométriques sont un peu différents entre les deux souches testées. Ces résultats soulignent la variabilité qui caractérise *Brettanomyces* et montrent qu'il reste difficile de comparer des résultats issus d'études de souches différentes.

Nous avons aussi trouvé différentes valeurs de α_{acc} . Il faut rappeler que les expériences pour la souche B5d ont été effectuées dans des différents fermenteurs. Le coefficient de transfert de l'oxygène (k_{La}) varie entre chacun des réacteurs utilisés. Cette différence dans le transfert d'oxygène pourrait être l'explication des différentes valeurs de α_{acc} retrouvées. Néanmoins, nous ne pouvons pas valider cette hypothèse car l'influence de l'oxygène sur le métabolisme de *Brettanomyces* n'a pas été étudiée durant ce travail.

5.2.4. Comparaisons entre données expérimentales et données simulées.

Les **figures 5.9, 5.10 et 5.11** comparent les concentrations mesurées lors des fermentations avec les valeurs calculées pour le schéma réactionnel proposé. Ces profils sont totalement superposés, ce qui prouve la validité du schéma réactionnel testé (écart $< 10\%$). Seul un léger décalage pour les profils de consommation d'oxygène est observé. Cette différence peut s'expliquer par la sensibilité de l'analyseur de gaz qui empêche une mesure fine de ce paramètre qui varie en faible concentration entre le gaz d'entrée et de sortie (21% en entrée et 20,5% pour la concentration la plus basse).

Notons que le schéma réactionnel validé est un schéma réactionnel apparent, qu'il ne constitue pas une solution unique au problème. D'autres schémas pourraient être certainement validés. Néanmoins celui-ci permet de représenter très correctement l'ensemble des données expérimentales obtenues et il ne présente pas de contradictions avec la connaissance théorique du métabolisme de *Brettanomyces*. Couplé avec des modèles cinétiques pour chacune des réactions, il pourrait donc être utilisé pour la modélisation complète de l'évolution des composés au cours des fermentations. Cette étape d'établissement des équations cinétiques des réactions à partir des avancements trouvées par l'optimisation n'a pu être réalisée, faute de temps. Néanmoins, dans le paragraphe suivant, nous discutons de l'influence de chacun des paramètres sur ces avancements ce qui permet de dégager des pistes sur les variables qui seraient à prendre en compte dans l'établissement des cinétiques.

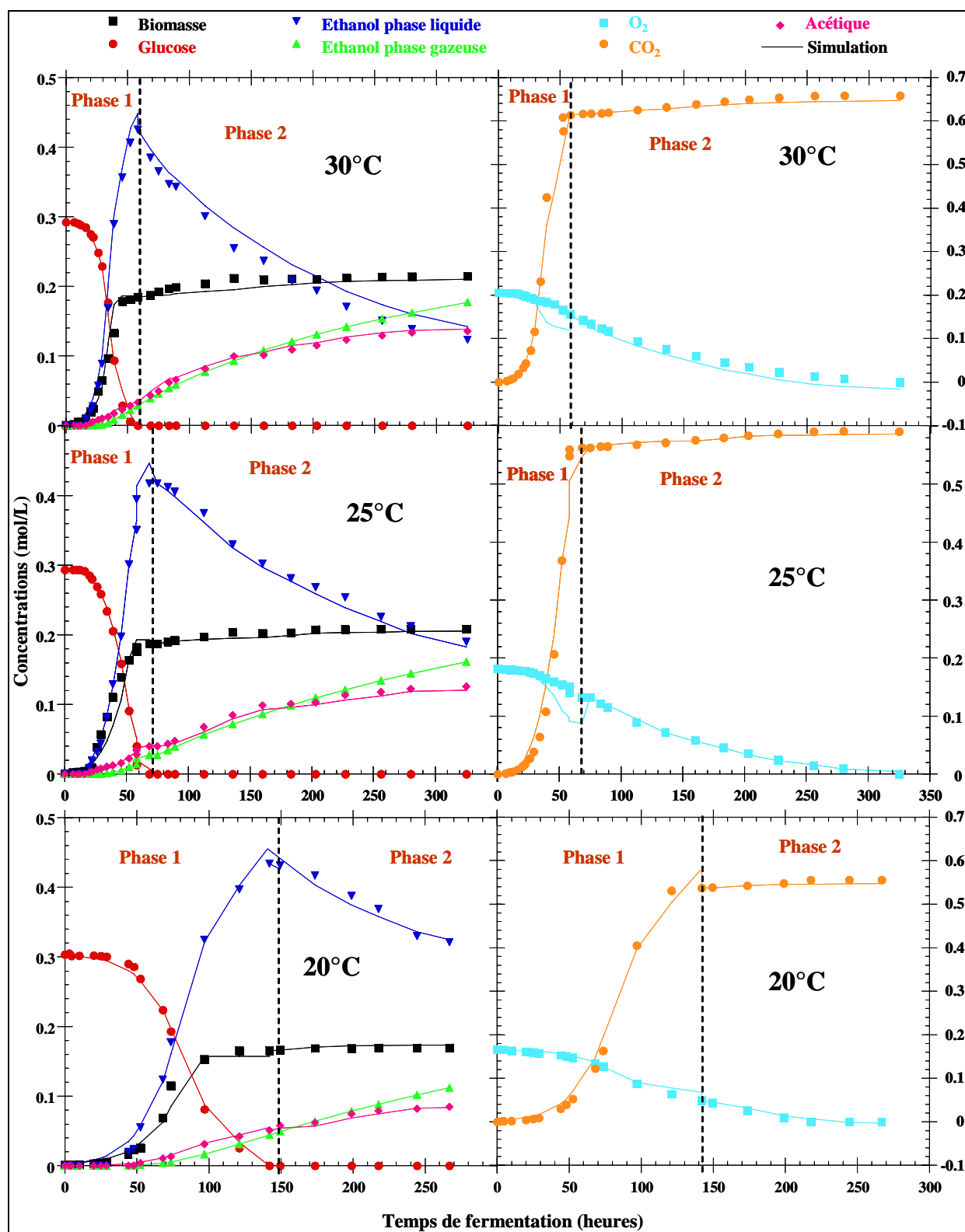


Figure 5.9. Comparaison entre données expérimentales et données calculées pour *B. bruxellensis* vin (B2) à différentes températures à partir du schéma réactionnel.

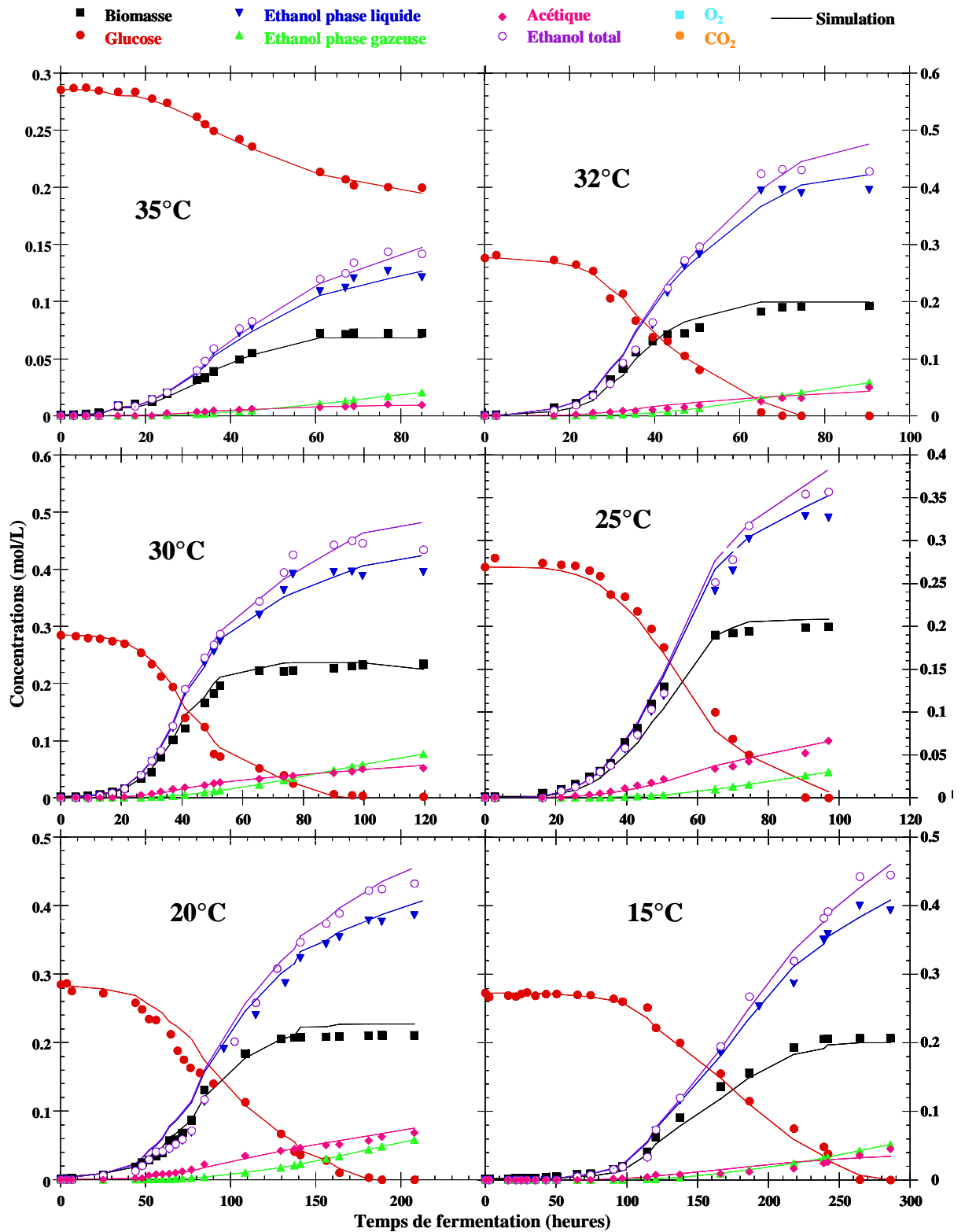


Figure 5.10 Comparaison entre données expérimentales et données calculées pour *Brettanomyces bruxellensis* distillerie à différentes températures (B5d).

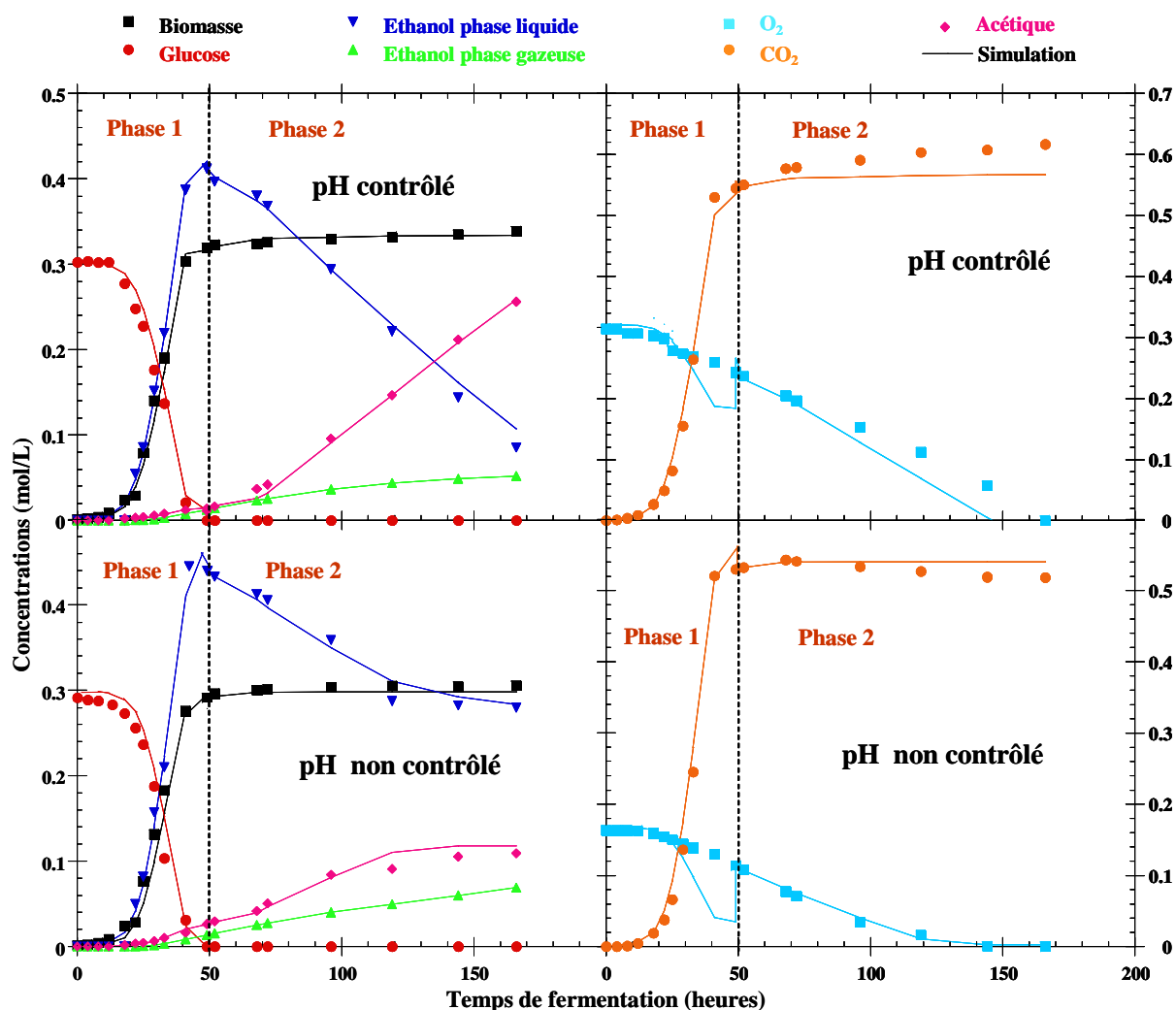


Figure 5.11 Comparaison entre données expérimentales et données calculées pour *Brettanomyces bruxellensis* distillerie (B5d) à différentes conditions de pH.

5.2.5. Analyse des avancements de réactions.

Les avancements des réactions R1 à R6 qui découlent de l'analyse factorielles sont présentés sur les figures de l'**annexe 2**, pour chaque température, chaque condition de pH et chaque souche.

A titre d'exemple, nous présentons les résultats obtenus sur les avancements de réaction pour la fermentation à 30°C avec la souche B2 (**figure 5.12**).

- Pour la phase consommation de glucose, les réactions 1 à 3 sont actives, tandis que les réactions 5 et 6 ne sont pas actives. Ceci signifie que les

cinétiques de ces 2 réactions devront prendre en compte une inhibition par le glucose : tant que du glucose est présent ces réactions sont totalement inhibées.

- Dans la phase de consommation de l'éthanol, les réactions 1 à 3 ne sont plus actives puisque le substrat glucose n'est plus présent, tandis que les réactions 5 et 6 sont actives (disparition de l'inhibiteur glucose).
- La réaction 4 elle active tout au long de la fermentation. Sa vitesse est proportionnelle à l'éthanol présent en phase liquide : elle augmente donc dans la première phase avec la production d'éthanol puis diminue (rupture de pente de l'avancement de réaction) dans la seconde avec la consommation de l'éthanol.

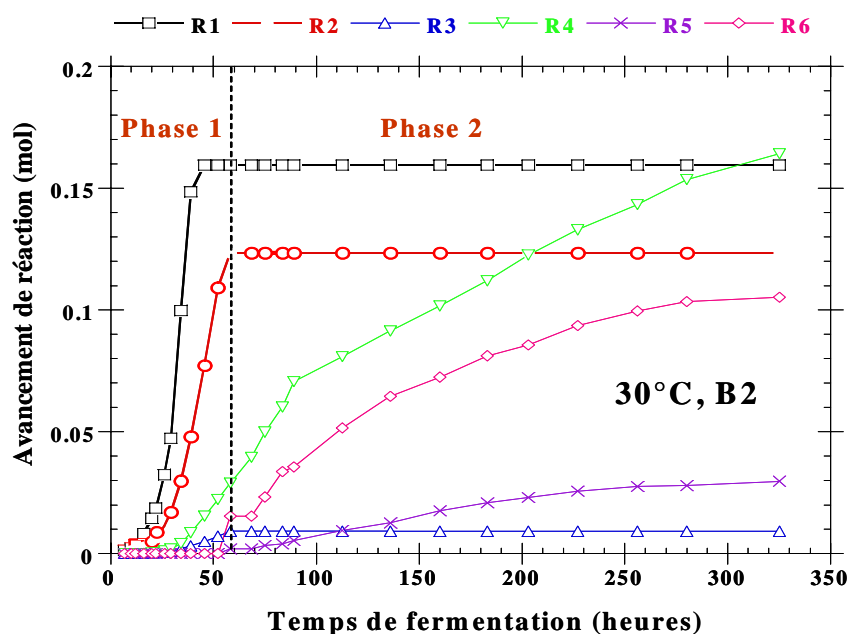


Figure 5.12. Avancements de réactions impliquées dans le métabolisme de *B. bruxellensis* vin (B2) à 30°C.

a) Influence de la température sur les avancements de réaction

Dans le **tableau V.3** sont récapitulés les avancements finaux obtenus pour chacune des 6 réactions du schéma réactionnel validé en fonction des 6 températures testées pour la souche B5d. On observe que les avancements pour R1, R2 et R3 sont peu affectés par un changement de température entre 15 et 32°C. Par contre, à 35°C les avancements de ces trois réactions sont très faibles, ce qui pourrait être dû à une inhibition enzymatique dans les réactions impliquées dans le métabolisme de *Brettanomyces*.

Tableau V.3. Comparaison des avancements de réaction finaux à différentes températures en *B. bruxellensis* distillerie (B5d).

Phase I	Température (°C)	R1	R2	R3	R4
Consommation du glucose	35	0.054	0.035	0.002	0.020
	32	0.160	0.150	0.012	0.059
	30	0.188	0.097	0.014	0.058
	25	0.167	0.072	0.023	0.030
	20	0.181	0.103	0.027	0.059
	15	0.160	0.116	0.008	0.052

Dans le **tableau V.4** sont récapitulés les avancements finaux obtenus pour chacune des 6 réactions du schéma réactionnel validé en fonction des 3 températures testées pour la souche B2. Ainsi pour chacune des réactions, nous pouvons déterminer la température qui favorise son évolution. Pour la consommation de glucose, nous avons 3 réactions compétitives pour le même substrat. Les réactions R2 et R3 sont optimales à 20°C alors que R1 l'est à 25°C. A 30°C, les 3 réactions ont des avancements moindres.

Pour la consommation d'éthanol, l'optimum de consommation se situe par contre à 30°C aussi bien pour la production de biomasse (R5) que pour la transformation en acide acétique (R6).

Tableau V.4. Comparaison des avancements de réaction finaux à différentes températures en *B. bruxellensis* vin (B2).

Phase	Température (°C)	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1) consommation du glucose	30	0.160	0.124	0.009	0.022	-	-
	25	0.166	0.118	0.012	0.010	-	-
	20	0.135	0.162	0.021	0.044	-	-
2) consommation d'éthanol	30	-	-	-	0.142	0.030	0.105
	25	-	-	-	0.094	0.021	0.080
	20	-	-	-	0.028	0.009	0.033

b) Influence du pH sur les avancements de réaction

Dans le **tableau V.5** sont récapitulés les avancements finaux obtenus pour chacune des 6 réactions du schéma réactionnel validé en fonction des 2 conditions de pH testées pour la souche B5d.

Tableau V.5. Comparaison des avancements de réaction finaux à différentes conditions de pH en *B. bruxellensis* distillerie (B5d).

Phase	pH	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1) consommation du glucose	Contrôlé	0.255	0.035	0.002	0.013	-	-
	Non contrôlé	0.224	0.080	0.008	0.014	-	-
2) consommation d'éthanol	Contrôlé	-	-	-	0.012	0.018	0.248
	Non contrôlé	-	-	-	0.013	0.009	0.092

Sur la première phase (consommation du glucose) les avancements sont peu affectés, notamment pour R1. Les avancements de R2 et R3 varient ce qui signifie que le pH joue sur les activités enzymatiques de production de l'éthanol et de l'acide acétique à partir d'acétaldéhyde. Cependant, les avancements sont très faibles pour ces deux réactions et donc peu de différences sont observées sur les quantités produites.

Sur la seconde phase, la consommation d'éthanol, l'effet du pH est là par contre très visible. Un pH contrôlé à 4 permet des avancements de réactions de R5 et R6 beaucoup plus importants que lorsque le pH est non contrôlé et se situe à une valeur de 2. Ceci

signifie que dans les lois cinétiques des réactions R5 et R6, l'influence du pH doit être prise en compte.

5.3. Conclusion

Nous avons pu dans ce chapitre grâce à la méthode de l'analyse factorielle proposer un schéma réactionnel apparent qui permet de bien représenter l'ensemble des données expérimentales. Dans la démarche, il est intéressant de noter comment l'analyse cinétique préliminaire du chapitre 4 a été utilisée pour simplifier le problème d'optimisation et permettre sa résolution. Sans les déductions liées à cette étude, la minimisation de notre problème ne fonctionnait pas, le nombre de variables d'optimisation étant trop important par rapport aux mesures expérimentales. D'un point de vue méthodologique, pour des systèmes complexes faisant intervenir de nombreuses réactions, il est donc conseillé d'exploiter au maximum les données expérimentales disponibles afin d'en tirer le maximum de connaissances pour simplifier la méthode de l'analyse factorielle.

Conclusions Générales
et
Perspectives

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse est le résultat des travaux réalisés sur des levures du genre *Brettanomyces* au sein du laboratoire de génie chimique (LGC). Les principaux objectifs de cette thèse étaient de:

- Montrer la difficulté d'établir un contrôle sur le développement de *Brettanomyces* en fonction de la variabilité de souches isolées dans l'industrie.
- Mieux comprendre l'influence des paramètres environnementaux sur la croissance de cette levure.
- Construire des modèles pour prédire le développement de *Brettanomyces* au cours de la fermentation.
- Etudier et mieux comprendre le métabolisme et la cinétique des levures du genre *Brettanomyces* vis-à-vis de la température et du pH.

Pour répondre à ces objectifs, une étude préliminaire a tout d'abord été menée. Les profils cinétiques montrent qu'il existe une incroyable diversité de comportement pour des levures pourtant de même nature. Pour les 4 souches testées, nous avons obtenu 4 types de profils différents. Ces profils varient drastiquement par rapport à la concentration en éthanol dans le milieu de culture.

A partir de cette étude préliminaire, il est donc impossible d'établir un comportement type pour les levures du genre *Brettanomyces*. De ce fait nous avons pris conscience de toute la difficulté, et risque, de proposer des solutions généralistes pour faire face à la contamination. On s'est alors ensuite orienté sur le choix d'une souche pour réaliser la suite de l'étude sur le développement de *Brettanomyces* dans le vin.

Une fois la souche sélectionnée, nous avons étudié l'effet des facteurs environnementaux (pH, concentration en éthanol, concentration du dioxyde de soufre et température) par le biais d'un plan d'expériences sur la croissance de *Brettanomyces*. Le plan d'expériences nous a permis de déterminer les principaux facteurs influents sur la phase de latence, la vitesse spécifique de croissance et la population maximale de cette levure. Basé sur ces résultats un modèle de type loi Logistique a été ensuite appliqué pour prédire l'évolution de la croissance de *Brettanomyces* au cours de la culture.

Dans une seconde partie de la thèse, nous avons étudié le métabolisme et la cinétique des levures *Brettanomyces* vis-à-vis de la température et du pH.

Les résultats sur l'effet de la température pour la souche B5d (*B. bruxellensis* distillerie) ont montré que ce paramètre n'a pas d'influence sur la croissance de *Brettanomyces* pour des températures comprises entre 15 et 32°C. Par contre, à 35°C un arrêt de la croissance et des activités métaboliques a été observé. Dans le cas de la souche du vin (B2), nous avons observé qu'une augmentation de la température favorisait les vitesses de croissance, de consommation et production d'éthanol et d'acide acétique chez *Brettanomyces* (pour des températures comprises entre 20 et 30°C). Pour les deux souches la température n'a pas d'effet sur la quantité de substrat consommé ou de produits formés.

En ce qui concerne l'effet du pH, nous avons montré que la croissance est affectée lorsque le pH n'a pas été régulé. Plusieurs hypothèses ont été émises pour essayer de comprendre l'effet du pH. Toutefois, plusieurs questions restent à élucider comme une éventuelle inhibition enzymatique de la réaction de production d'acide acétique du fait d'une baisse de pH. D'autre part, lorsque le glucose était le substrat, nous n'avons pas observé de différence entre la production d'éthanol et d'acide acétique aux deux conditions de pH testées. En revanche, lors de la phase de consommation d'éthanol nous avons montré que la régulation du pH a un effet très positif sur la production d'acide acétique.

Par ailleurs, l'application du modèle Logistique et du modèle de Luedeking et Piret nous ont permis de réaliser une analyse cinétique des données expérimentales. En s'appuyant sur ces résultats et en réalisant des bilans matières et une analyse factorielle des données, nous avons proposé un schéma réactionnel. Ce schéma réactionnel se décompose donc en deux phases bien distinctes. Une première phase de consommation de glucose qui comporte 4 réactions concurrentes et une deuxième phase de consommation d'éthanol impliquant 3 réactions.

Il est important de noter que ce schéma réactionnel a été validé quelque soient les souches et les conditions opératoires testées. Seuls les coefficients stœchiométriques et

avancement de réactions varient. On pourra alors désormais se baser sur ce schéma réactionnel pour mieux comprendre le comportement de *Brettanomyces*.

Enfin, ces travaux ont permis d'apporter de nouvelles approches dans la compréhension de développement de *Brettanomyces* vis-à-vis des facteurs environnementaux dans un contexte œnologique et en général sur le métabolisme de ce genre de levure. Néanmoins, il faudra réaliser plusieurs études pour essayer d'élucider des nombreuses questions. Ainsi, nous allons proposer quelques perspectives qui seraient intéressantes de mener pour compléter ces travaux.

Tout d'abord, dans le contexte œnologique, on propose d'étudier les interactions qui pourraient exister entre *Brettanomyces* et d'autres micro-organismes qui interviennent dans l'élaboration du vin.

Ensuite, sur les aspects de la microbiologie prédictive, il serait intéressant de valider et développer des modèles qui permettraient d'étudier l'effet d'autres facteurs affectant la croissance de cette levure. Par exemple, l'effet de l'oxygène (micro-oxygénation) serait intéressant à étudier..

En ce qui concerne les aspects métaboliques, Le métabolisme de la levure est un ensemble de phénomènes excessivement complexes qui font intervenir des systèmes enzymatiques différents et dont le fonctionnement reste encore obscur. Il serait alors intéressant de développer quelques aspects :

- ⇒ Nous avons observé au cours de ces travaux que des souches *Brettanomyces* ont possiblement une capacité fructophile, c'est-à-dire, ayant une préférence pour la consommation de fructose. Donc, nous proposons d'étudier les mécanismes de consommations de substrats (glucose, fructose, éthanol...)
- ⇒ Il serait intéressant de prendre en compte l'effet de l'oxygène pour l'établissement du schéma réactionnel.

- ⇒ Basé sur le schéma réactionnel proposé nous avons donc suffisamment de connaissance pour l'établissement des lois cinétiques qui nous permettent de prédire l'évolution de la croissance et des composés au cours de la culture.

Enfin, suite aux résultats sur l'effet du pH, on propose d'explorer les possibilités de conversion d'acide acétique sur glucose et éthanol, ce qui pourrait constituer une possible application industrielle.

*Références
Bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**A**

- AGUILAR-USCANGA, M. G. (1998).** Caractérisation cinétique et métabolique d'une souche de *Brettanomyces*. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse* (France).
- AGUILAR-USCANGA, M. G., DELIA, M., STREHAIANO, P. (2000).** Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology*. 46, 1046-1050.
- AGUILAR-USCANGA, M. G., DELIA, M., STREHAIANO, P. (1999).** Estudio cinético sobre el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* en glucosa a diferentes concentraciones iniciales de ácido acético. *Microbiologie- Aliments- Nutrition*. 17, 181-190.
- AGUILAR-USCANGA, M. G., DELIA, M-L, STREHAIANO, P. (2003).** *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61,157-162.
- AGUILERA, F., BENITEZ, T. (1985).** Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*. 142, 389-392.
- ALDIGUIER, A. S., ALFENORE, S., CAMELEYRE, X., GOMA, G., URIBELARREA, J. L., GUILLOUET, S.E., MOLINA-JOUE, C. (2004).** Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Byosistems engineering*. 26, 217-222.
- ALEXANDRE, H., COSTELLO, P. J., REMIZE, F., GUZZO, J., GUILLOUX-BENATIER, M. (2004).** *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*. 93, 141-154.
- ALFENORE, S., MOLINA-JOUE, C., GUILLOUET, S. E., URIBELARREA, J. L., GOMA, G., BENDABIS, L. (2002).** Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60, 67-72.
- ALMEIDA-TAVARES, F.C. (1995).** Control of spoilage yeast in fuel alcohol production. *Biotechnology Letters*. 17, 1121-1126.
- ARNI, S., MOLINARI, F., DEL BORGHI, M., CONVERTI, A. (1999).** Improvement of alcohol fermentation of a corn starch hydrolysate by viscosity-raising additives. *Stärke/Starch*. 51, 218-224.
- AUGUSTIN, J. C. (1996).** Resistance of *Listeria monocytogenes* to physical exposure *Pathology and Biology*. An Review. Paris. 44-9,790-807.

AUGUSTIN, J. C., BROULLAUD-DELATTRE, A., ROSSO, L., CARLIER, V. (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*. 66-4, 1706-1710.

B

BARBIN, P. (2006). Contrôle et éléments de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse* (France).

BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 277– 294.

BARRET, A., BIDAN, P., ANDRE, L. (1955). Sur quelques accidents de vinification dus à des levures à voile. *Communications and Research of the Academy of Agriculture*, Paris, 41, 496.

BEAL, C., DESCHAMPS, N., JUILLARD, V., ROISSART, H., RICHARD, J., SARAUX, B. (1994). Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. Aspects fondamentaux et technologiques. Lorica (Ed), Uriage. 1, 367-401.

BEECH, F. W., THOMAS, S. (1985). Action antimicrobienne de l'anydride sulfureux. *Bulletin de l'O.I.V.* 652-653, 564-581.

BLACKWELL, K. J., SINGLETON, I., TOBIN, J. M. (1995). Metal cation uptake by yeast. A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43-4, 579-584.

BLONDIN, B., GONDE, P., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1984). A study of cyanide-insensitive respiration in the genus *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Microbiology and Immunology* 28, 637-644.

BLONDIN, B., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1982). A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2031-2037.

BONORA, A., MARES, D. (1982). A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic micro-organisms. *Current Microbiology*. 7, 217-222.

BREAND, S., FARDEL, G., FLANDORIS, J. P., ROSSO, L., TOMASSONE, R. (1997). A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *International Journal of Food Microbiology*. 38, 157-167.

BROCK, T. D. (1970). Biology of microorganisms. By Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

BUCHANAN, R. E. (1918). Life's phases in a bacterial culture. *Journal of Infection Diseases*. 23, 109-125.

BUCHANAN, R. L., CYGNAROWICZ, M. L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology*. 7, 237-240.

BUCHANAN, R. L., KLAWITTER, L. A. (1992). The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 9, 185-196.

BUCHANAN, R. L., SOLBERG, M. (1972). Interaction of sodium nitrate, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*. 37, 81-85.

C

CASTRO-MARTINEZ, C., ESCUDERO-ABARCA, B. I., GOMEZ RODRÍGUEZ, J., HAYWARD-JONES, P. M., AGUILAR-USCANGA, M. G. (2005). Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. *Journal of Food Process Engineering*. 28, 133-141.

CALDERON, F., MORATA, A., UTHURRY, C., SUAREZ, J. A. (2004). Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica. Últimos avances tecnológicos. *Tecnología del vino*. 16, 49-54.

CARRASCOSA, J. M., VIGUERA, M. D., NUÑEZ DE CASTRO, I., SCHEFFERS W. A. (1981). Metabolism of acetaldehyde and Custer effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 47, 209-215.

CASEY, G. P., INGLEDEW, W. M. (1986). Ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Microbiology*. 13, 219-280.

CASEY, G., MAGNUS, C. A., INGLEDEW, W. M. (1984). High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Applied Environmental and Microbiology*. 48, 639-646.

CASTRILLO, J. I., DE MIGUEL, I., UGALDE, U. O. (1995). Proton production and consumption pathways in yeasts metabolism. A chemostat culture analysis. *Yeast* 11. 1353-1365.

CHANDRASHEKAR, K., FELSE, A. P., PANDA, T. (1999). Optimization of temperature and initial pH and kinetic analysis of tartaric acid production by *Gluconobacter suboxydans*. *Bioprocess Engineering*. 20, 203-207.

CHARPENTIER, C. (1993). Les arrêts de fermentation: rôle de l'éthanol, résistance de la levure. *R.F. d'Enologie*. 140, 49-52.

CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces/ Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46, 463-468.

CHATONNET, P., MASNEUF, I., GUBBIOTTI, M. C., DUBOURDIEU, D. (1999). Prévention et détection des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vins. *Revue Française d'Oenologie*. 179, 20-24.

- CHATONNET, P., VIALA, C., DUBOURDIEU, D. (1997).** Influence of poly-phenolic compounds of red wine on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*. 48-4, 443-448.
- CHEROUTRE-VIALETTE, C., LEBERT, A. (2000).** Growth of *Listeria monocytogenes* as a function of dynamic environment at 10°C and accuracy of growth predictions with available models. *Food Microbiology*. 17, 83-92.
- CHEROUTRE-VIALETTE, C., LEBERT, A. (2002).** Application of recurrent neural network to predict bacterial growth in dynamic conditions. *Internaitonal Journal of Food Microbiolgy*. 73, 107-118.
- CHIN-HAN, S., SHANG-TIAN, Y. (1990).** Kinetic and modelling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 37, 567-574.
- CIANI, M., MACCARELLI, F., FATICHENTI, F. (2003).** Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 419-422.
- CIOLFI, G. (1991).** Ecologia dei lieviti vinari. *Vini d'Italia*. 33-6, 41-46.
- COMITINI, F., INGENIS DE, J., PEPE, L., MANNAZZU, I., CIANI, M. (2004).** *Pichia anomala* and *Kluveromyces wickerhammi* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 238, 235-240.
- CONVERTI, A., BARGAGLIOTTI, C., CAVANNA, C., NICOLELLA, C., DEL BORGHI, M. (1996).** Evaluation of kinetic parameters and thermodynamic quantities of starch hydrolyse fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*
- CRABTREE, H. G. (1929).** LXI. Observations of the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical Journal*. 23, 536-545.
- CUSTER, M. T. J. (1940).** Onderzoekingen over het Gistgeslascht *Brettanomyces*. *PhD Thesis, Delf University of Technology*. Meinema, Delft.

D

- DE MINIAC, M. (1988).** Conduite des ateliers de fermentation alcoolique de produits sucriers (mélasses et égouts). *Industries Agro-Alimentaires*, 105, 675-688
- DE MINIAC, M. (1989).** Contamination des fermentation alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces*. *I.A.A. Juillet/Août*. 559-563.
- DE MINIAC, M. (1991).** Utilisation des levures en fermentation alcoolique industrielle. *Dans Biotechnologie des Levures*. Larpent J.P. (coord). Ed. Masson. Paris.
- DE TOLEDO, Z. O., TEIXEIRA, C. G., VERONA, O. (1959).** Prime ricerche sopra i lieviti prensati sulle uve e nei mosti della regione viticola di S. Paolo (Brasile). *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 9, 22-34.

- DELFINI, C., GAIA, P., SCHELLINO, R., STRANO, M., PAGLIARA, A., AMBRO, S. (2002).** Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5605-5611.
- DELIA-DUPUY, M. L., AGUILAR, M. G., STREHAIANO, P. (1997).** Influence of oxygen supply on the metabolism of *Brettanomyces bruxellensis*. 19th ISSY. *Yeast in the Production and Spoilage of Food and Beverages*. 30 August- 3 Septembre. Praga, Portugal.
- DELIA-DUPUY, M. L., DE MINAC, M., PHOWCHINDA, O., STREHAIANO, P. (1995).** Contamination par les levures *Brettanomyces* dans les fermentations alcooliques. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*. 13, 349-359.
- DELIA-DUPUY, M-L., PHOWHINDA, O., STREHAIANO, P. (1993).** *Brettanomyces* development during alcoholic fermentation from beet molasses and its control. *Communication Distilled Beverages Industry Fermentation Technology Conference*, Orlando (Floride, USA). 21-25 May 1993: *Distilled Beverages Industry Fermentation Technology*, *Lallemand* (Ed), Toulouse, 73-80.
- DELTEIL, D. (1995).** Caractères organoleptiques des vins rouges méditerranéens. *Vignevini* N.10, 39-43.
- DI STEFANO, R. (1985).** Gli etil fenoli nei vini. *Vegnevini*. 5, 35-38.
- DOMBEK, K. M., ET INGRAM, L. O. (1988).** Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in rate of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* during batch fermentation. *Applied Environmental and Microbiology*. 54, 98-104.
- DORANGE, J. L., DUPUY, P. (1972).** Mise en évidence d'une action mutagène du sulfite de sodium sur la levure. *C. R. Académie de Science*. Paris, série D. 274, 2798-2800.
- DU TOIT, W. J., PRETORIUS, I. S., LONVAUD-FUNEL. (2005).** The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettaomyces* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 862-871.

E

- EDDY, A. A. (1982).** Mechanisms of solute transport in selected eukariotic microorganisms. *Adv. Microbiology and Physiology*. 23, 1-78.
- ESENER, A. A., VEERMAN, T., ROELS, J. A., KOSSEN, N. W. F. (1982).** Modeling of bacterial growth; formulation and evaluation of a structured model. *Biotechnologie and Bioingeniering*. 24, 1749-1764.
- ESSIA NGANG, J. J., LETOUNEAU, F., VILLA, P. (1989).** Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31, 125-128.

F

- FILLON, M. (1996).** Développement d'une méthodologie pour la modélisation et la simulation des réacteurs discontinus. Application à la fermentation brassicole. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France)*.
- FLEET, G. H., HEARD, G. M. (1993).** Yeast: growth during fermentation. In: Fleet GM (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur Switzerland, pp. 27-54.
- FREER, S. N. (2002).** Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 271-275.
- FREER, S. N., DIEN, B., MATSUDA, S. (2003).** Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19, 101-105.
- FROUDIERE, I., LARUE, F. (1988).** Conditions de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 2, 296-303.
- FUGELSANG, K. (1998).** *Brettanomyces* : Dr. Jekyll ou Mr. Hyde des vins ?. *Biofutur*. 182, 22-23.

G

- GALZY, P., RIOUX, J. A. (1955).** Observations sur quelques vins atteints par la maladie de "la fleur" dans le midi. *Progrès Agric. et Vitic.* 144, 365-370.
- GANCEDO, C., SERRANO, R. (1989).** Energy-yielding metabolism. In: The Yeasts: Metabolism and Physiology of Yeasts. 2nd ed. Vol. 3. Rose A. H. and Harrison J. S. Academic Press Limited. London. 205-251.
- GARCIA-OCHOA, F., GARCIA-LEON, M. A., ROMERO, A. (1990).** Kinetic modelling of xanthan production from sucrose. *Chemical and Biochemical Engineering*. 4, 15-20.
- GAUNT, D. M., DEGN, H., LLOYD, D. (1988).** The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast*. 4, 249-255.
- GERBAUX, V., JEUDY, S., MONAMY, C. (2000).** Les phénols volatils dans les vins de Pinot noir de Bourgogne. *Bulletin de l'O. I. V.* 73, 581-599.
- GEROS, H., AZEVEDO, M. M., CASSIO, F. (2000).** Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technology and Biotechnology*. 38, 59-62.
- GEROS, H., CASSIO, F., LEO, C. (1997).** Glucose transport mechanism in the yeast *Dekkera anomala*. 18th ISSY. *Yeast Nutrition and Natural Habitats*, August: 24-29, 1997. Bled, Slovenia.

GEROS, H., CASSIO, F., LEAO, C. (1998). Biochemical studies on the production of acetic acid and ethanol by the yeast *Dekkera anomala*. 19th ISSY. "Yeast in the production and spoilage of food and beverages". 30 august-3 september. Braga, Portugal.

GEROS, H., CASSIO, F., LEAO, C. (1998). Transport of acetic acid and its regulation in the yeast *Dekkera anomala*. 19th ISSY. "Yeast in the production and spoilage of food and beverages". 30 august-3 september. Braga, Portugal.

GILIS, J. F., DUCOURNAU, P., LEAUTE, B., STREHAIANO, P. (2003). Effet des apports d'oxygène et des sucres résiduels sur la croissance de *Brettanomyces* sp. et la production de phénols volatils. Communication au VII^e Symposium International d'Oenologie. 2003, 19-21 juin.

GILIS, J. F. (1999). Etude de Contaminations de Fermentations Alcooliques Industrielles par les levures *Brettanomyces*. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France).

GOMEZ-RIVAS, L., ESCUDERO-ABARCA, B. I., AGUILAR-USCANGA, M.G., HAYWARD-JONES, P. M., MENDOZA, P., RAMIREZ, M. (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeast in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31, 16-22.

GUNISSON, A. F., (1981). Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmetology and Toxicology*. 19, 667-682.

H

HAYASHIDA, S., OHTA, K. (1981). Formation of high concentration of alcohol by various yeasts. *Journal Inst. Brew.* 87, 42-44.

HEARD, G. M., FLEET, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied Environmental Microbiology*. 50, 727-728.

HENICK-KLING, T., EGLI, C., LICKER, J., MITRAKUL, C., ACREE, T. E. (2000). Preceeding of the 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology, Melbourne, Australia, 16-20 January.

HENSCHKE, P. (1996). Technical notes: *Brettanomyces* in Porto wine. *Technical Review of the Australian Wine Research Institute*. 105, 12-13.

HERESZTYN, T. (1986). Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxynnic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology*. 46, 96-98.

HUDSON, J. A. (1993). Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Letters in Applied Microbiology*. 16, 274-276.

HUDSON, J. A., MOTT, S. J. (1994). Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Food Safety*. 14, 329-339.

I

INGRAM, L. O., BUTTKE, T. M. (1984). Effects of alcohols on micro-organisms. *Adv. Microbiology and Physiology*. 25, 253-300.

J

JONES, R. P., PAMMENT, N., GREENFIELD, P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts-the effect on environmental and other variables. *Process Biochemistry*. 16, 42-49.

K

KAPPELI, O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. *Adv. Microbiology and Physiology*. 28, 181-209.

LACAZE, B., MAILHES, C., MAUBOURGUET, M., TURNERET, J. Y. (1997). Probabilités et statistiques appliquées-Résumé de cours et illustrations. In: Cépaduès, B. (ed.), Collection Polytechnique d'INP de Toulouse. Cépaduès, Toulouse. Pp. 355.

L

LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Wine and brandy. In:Rehm HJ, Reed G (eds) Food and Feed Production with Microorganism, Biotechnology, vol 5, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 81-163.

LAGUNAS, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2, 221-228.

LANGE, H., BAVOUZET, J.M., TAILLANDIER, P., DELORME, C. (1993) Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions, *Biotechnology Techniques*. 7-3, 223-228.

LARPENT-GOURGAUD M., SANGLIER, J. J. (1991). *Biotechnologies, Principes et méthodes*, Doin (Eds), Collection Biosciences et Techniques, Paris, 668 pages.

LARUE, F., ROZES, N., FROUDIERE, I., COUTY, C. PERREIRA, G. P. (1991). Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 25, 149-165.

LEAO, C., VAN UDEN, N. (1982). Effects of ethanil and other alkanols on the glucosa transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 24, 2601-2604.

LIU, S., LIN, C., XIE, L., CAO, Z. (2003). Intrecellular pH and Metabolic Activity of long-chain dicarboxylic acid-producing yeast *Candida tropicalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96-4, 349-353.

LONVAUD-FUNEL, A. (2000). Les aspects microbiologiques de l'élevage des vins rouges en barriques. V^{ème} colloque des Sciences et Techniques de la Tonnellerie. Connaissances actuelles et avenir de l'élevage en barriques. 47-51.

LUCERO, P., PEÑALVER, E., MORENO, E., LAGUNAS, R. (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental and Microbiology*. 66, 4456-4461.

LUEDEKING, R., PIRET, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. *Journal of Biochemical Microbiology and Technology Engineering*. 1, 393-412.

M

MACRIS, B. J., MARKAKIS, P. (1974). Transport and toxicity of sulfur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 25, 21-29.

McMEEKIN, T. A., OLLEY, J., ROSS, T., RATKOWSKY, D. A. (1993). Predictive Microbiology: Theory and Application. Research Studies Press., Taunton, UK. 340 pp.

MCMEKIN, T. A., OLLEY, J., RATKOWSKY, D. A., ROSS, T. (2002). Predictive Microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 73, 395-407.

MAIORELLA, B. L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R., 1984. Feed component inhibition of ethanolic fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 26, 1156.

MAIORELLA, B., BLANCH, H., W., WILKE, C. R. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnologie and Bioingeniering*. 25, 103-121.

MALFEITO-FERREIRA, M. (2005). Avances recientes en el control de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en vinos. *Enotour 2005*. Agrovín, Zaragoza, Spain. 28-30 June.

MARTINEZ, E. A. (1999). Estudo de parâmetros do sistema contínuo de produção de xylitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. *Master's Thesis, FAENQUIL, Lorena-SP. Brazil*.

MARTINEZ, E. A., SILVA, S. S., ALMEIDA E SILVA, J. B., SOLENZAL, A. I. N., FELIPE, M. G. A. (2003). The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondi*. *Process Biochemistry*. 38, 1677-1683.

MASON, R. L., GUNST, R. F., HESS, J. L. (1989). Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science. John Wiley and Sons. New York.

- MAUNG, M. (1987).** Contribution à l'étude des dégradation des pristinamycines en cours de culture de *Streptomyces pristinaespiralis* et des procédures minimisant ce processus. *Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées*. Toulouse, France.
- MEDAWAR, W. STREHAIANO, P., DÉLIA, M. L. (2003).** Yeast growth: lag phase modeling in alcoholic media. *Food Microbiology*. 20, 527-532.
- MILAR, D. G., GRIFFITHS-SMITH, K., ALGAR, E., SCOPES, R. K. (1982).** Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters*. 4, 601-606.
- MILLET, V., LONVAUD-FUNEL, A. (2000).** The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*. 30, 136-141.
- MOLLE, J. F. (1988).** L'éthanol-carburant. *I. A. A.*, Juillet/Août. 661-671.
- MONOD, J. (1942).** Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Dir. J. Bordet. Actualités Scientifiques et industrielles. Hermann et Cie. Paris.
- MOREAU, A. (2000).** Contribution au contrôle de la culture de *Brevibacterium linens* en réacteur batch. Modélisation et optimisation des cinétiques de croissance sur substrat mixte. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France)*.
- MOULIN, G., BOZE, H., GALZY, P. (1984).** Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnology Gen. Eng. Revue* 2, 365-382.

N

- NAGODAWITHANA, T .W., STEINKRAUS, H. K., (1976).** Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *S. cerevisiae* in rapid fermentation. *Applied Environmental and Microbiology*. 31, 158-162.
- NAGODAWITHANA, T. W., WHITT, J. T., CUTAIA A. J., (1977).** Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *Journal American of. Society. Brewing. Chemical*. 35, 179- 173.
- NAVARRO, J. M. (1980).** Fermentation alcoolique: influence des conditions de culture sur l'inhibition par l'éthanol. *Cellular Molecular Biology*. 26, 241-246.
- NEDWELL, D. B. (1999).** Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Letters*. 30, 101-111.
- NOVAK, M., STREHAIANO, P., MORENO, M., GOMA, G. (1981).** Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 23, 201-211.

O

- OUGH, C. S., CROWELL, E. A. (1987).** Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science*. 52-2, 386-393.

OURA, E. (1974). Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. 16-9, 1197-1212.

P

PALMQVIST, E., GRAGE, H., MEINANDER, N. Q. (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic, acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*. 63-1, 46-55.

PAMPULHA, E., LOUREIRO-DIAZ, M. C., (1989). Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31, 547-550.

PAMPULHA, E., LOUREIRO-DIAZ, M. C., (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34, 375-380.

PAREKH, S. R., PAREKH, R. S., WAYMAN, M. (1998). Fermentation of xylose and cellobiose by *Pichia stipitis* and *Brettanomyces clausenii*. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 18, 325-338.

PETRIK, M., KÄPPEL, O., FIECHTER, A. (1983). An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation. *Journal of Genetic and Microbiology*. 129, 43-49.

PEYNAUD, E., DOMERCQ, S. (1956). Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv. Für Mikrob.*, **24** (8): 266-280.

PHOWCHINDA, O., DELIA-DUPUY M-L., STREHAIANO, P. (1995). Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. 17, 237-242.

PIRT, S. J. (1975). Principles of Microbe and Cell Cultivation. Black-well, Oxford. 247 pp.

PIRT, S. J. (1988). Reflection on the dynamics of growth and product formation in microbial cultures. Dans: Horizons of Biochemical Engineering. Oxford University Press.

POSTGATE, J. R. (1967). Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress. *Adv. Microbiology and Physiology*. 1, 1-23.

POSTMA, E., VERDUYN, C., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P.(1989). Enzymic analysis of the Cabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*.55-2, 468-477.

PRESCOTT, M., HARLEY, J. P., KLEIN, D. (1995). *Microbiologie*, De Boeck Université (Eds), Bruxelles, 1014 pages.

PRETORIUS I. S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*. 16, 675-729.

PUIG, A., VILAVELLA, M., DAOUDI, L., GAUMIS, B., MINGUEZ, S. (2003). Microbiological and biochemical stabilization of wines by application of high pressure processing. *Bulletin de l'O.I.V.* 76, 596-617.

R

RAHN, O., CONN, J. E. (1944). Ind. Engng. Chem. Ind. Ed., -Forsch. 118, 413-429.

RAMON-PORTUGAL, F. (1991). Optimización del proceso para la elaboración de un cultivo madre de bacterias lácticas a base de suero de leche. *Thèse Master of Science de l'Institut Technologique de Veracruz (Mexique).*

RAMON-PORTUGAL, F. (1995). Interaction de type killer entre levures : analyse cinétique, co-culture et modélisation. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France).*

RAMOS, M. T., MEDEIRA-LOPES, A. (1990). Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. 12, 229-234.

RASMUSSEN, J. E., SCHULTZ, E., SNYDER, R. E., JONES, R. S., SMITH, C. R. (1995). Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46, 278-280.

RAVAZ, N. (1992). Croissance de populations levuriennes mixtes. Effet Killer: analyse et modelisation. *Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse, France.*

REHM, J. H., WITTMAN, H., (1962). Z. Lebensmithtelunters U.-Forsch. 118, 413-429.

REHM, J. H., WITTMAN, H., (1963). Z. Lebensmithtelunters U.-Forsch. 120, 465.

RENOUF, V. (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres-relation avec la qualité du vin. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France).*

RIBA, J. P., GOMA, G., (1981). Procédés d'extraction de l'éthanol et fermentation extractive. *Colloque Société Française de Microbiologie*. REIMS (France). 1981, 83-108.

RIBEREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., RIBEREAU-GAYON, P. SUDRAUD, P. (1975). Traité d'œnologie. *Sciences et techniques du Vin*. Tomo 2nd. Ed. Dunod, Paris: 306-318.

RIBEREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A. (1998). *Traité d'œnologie - tome 1 - Microbiologie du vin, vinification*, Dunod (Eds), Paris, 617 pages.

ROMANO, P., SUZZI, G. (1992). Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: *Wine Technology and Biotechnology*. Pp. 373-393. G. H. Fleet. Ed. Harwood, Academic Publishers, Chur. Suisse.

ROMANO, P., SUZZI, G. (1993). Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 15,108-1, 23-6.

RUIZ-HERNANDEZ, M. (2003). Casein for correction of defects caused by *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Semana Vitivinícola*. 58, 1462-1463.

S

SABLAYROLLES, J. M. (1992). Importance de l'azote assimilable et de l'oxygène sur le déroulement de la fermentation alcoolique. *Biologia Oggi VI (1-2)*. 155-160.

SAEZ, C. (1986). Etude des paramètres de la fermentation alcoolique. Application à l'élaboration de pétillant de raisin. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse* (France).

SALMON, J. M. (1994). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83-3, 253-260.

SANCHEZ, S., BRAVO, V., CASTRO, E., MOYA, A. J., CAMACHO, F. (1997). The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbiology Technology*. 21, 355-360.

SÁNCHEZ, S., BRAVO, V., MOYA, A. J., CASTRO, E., CAMACHO, F. (2004). Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. *Process Biochemistry*. 39, 673-679.

SCHANDERL, H., DRACZINSKI, M. (1952). *Brettanomyces*, eine lästige hefegattung im flashenvergorenen schaumwein. *Wein und Rebe*. 20, 462.

SCHEFFERS, W. A. (1979). Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek*. 45, 150.

SCHEFFERS, W. A. (1992). Contaminants in Baker's yeast, proceeding of the COMMET course on Microbial Contaminants. Helsinki 1991 and 1992. Ed. By M. Korhola and V. Bacstrom. Research. 7, 19-36.

SCHEFFERS, W. A., MISSET, O. (1974). The Custers effect in *Brettanomyces intermedius*. In Proceedings of the fourth International Symposium on Yeasts, Vienna. Austria. 39-40.

SCHEFFERS, W. A., NANNINGA, G. L. (1977). Conference on metabolic reactions in yeast cell in aerobic and anaerobic conditions. Eurochem. 53. Helsinki, Finlande.

SCHÜGERL, K. (1985). Bioreaction engineering 1: Fundamentals, thermodynamics, formal kinetics, idealized reactor types and operation modes. John Wiles and Sons.

SERRA, A. (2004). Production d'hybrides *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* : contraintes physiologiques et procédé. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse* (France).

- SERRA, A., STREHAIANO, P., TAILLANDIER, P. (2005).** Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International of Food Microbiology*. 104, 257-265.
- SHEHATA, A. M., MRAK, E. M. (1951).** *The American Naturalist*. 85, 31-383/ cite dans FULGENSANG K. (1998). *Brettanomyces* : Dr. Jekyll ou Mr. Hyde des vins ?. *Biofutur*. 182, 22-23.
- SHUNG-CHANG, J., LEE FWU-LING, BENGSTON, L. (1985).** Direct evidence of relationship between *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Micotaxon*. XXIII. 271-273.
- SHÜT, M., GAFNER, J. (1993).** Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 551-558.
- SMITH, M. TH., VAN GRINSVEN, A. M. (1984).** *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 50, 143-148.
- SOTO-CRUZ, O., FAVELA-TORRES, E., SAUCEDO-CASTANEDA, G. (2002).** Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Prog.* 18, 193-200.
- SUAREZ, R., SUAREZ-LEPE, J. A., MORATA, A., CALDERON, F. (2006).** The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chemistry*.
- STREHAIANO, P. (1984).** Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. *Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse*, France.
- SUAREZ-LEPE, J. A., IÑIGO, B. (2004).** El género *Brettanomyces*. In *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*. Ed. Mundiprensa, Madrid. 422-424.

T

- TAHERZADELH, M. J., NIKLASSON, C., LIDEN, G. (1997).** Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*?. *Chemistry Engineering Science*. 52, 2653-2659.
- TAILLANDIER, P. (1990).** Désacidification de moûts par *Saccharomyces*. Analyse cinétique et métabolique. *Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse*, France.
- TORIJA, M. J., ROZÈS, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J. M., MAS, A. (2002).** Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International of Food Microbiology*. 80, 47-53.
- TUCKNOTT, J. (1977).** The mousy taint in fermented beverages: its nature and origin. *Thèse de doctorat de l'Université de Bristol* (Royaume Uni de Grande Bretagne).

U

URBANO, I., VASCONCELOS, R., CAVALINI, F. C., JACOMINO, A. P., TREVISAS, M. J. (2005). Temperature-related changes in respiration and Q₁₀ coefficient of guava. *Sci. Agric.* 5, 458-463.

V

VAN DER WALT J. P., VAN KERKEN A. E., (1959). The wine yeast of the Cape-II-The occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii* in South African table wines. *Antonie van Leeuwenhoek.* 25, 145-151.

VAN DER WALT, J. P. (1970). The genus *Dekkera* van der Walt. In: The yeasts: a taxonomic study. 2nd ed. J. Lodda. North Holland Publ. Co. Amsterdam. 154-165.

VAN DER WALT, J. P. (1984). *Brettanomyces* Kufferath et van Lair. In *The Yeast. A Taxonomic study.* 3rd. edn. Ed. Kreger-van Rij. N.J.W. pp. 562-567. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

VAN DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A. (1984). Studies on alcoholic fermentation in yeasts. *Inovations in Biotechnology.* Ed. By Houwink E.H. and Van der Meer R.R. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 497-506.

VAN DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A., (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology.* 32, 199-224.

VENKATA, R. K., CHARYULU, N.C. L. N., KARANTH, N. G. (1991). A mathematical model for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6: production of biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 51, 525-538.

VERHULST, P. F. (1838). Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Nouv. Mém. de l'Academie Royale des Sci. et Belles-Lettres de Bruxelles.* 18, 1-41.

W

WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., DAVIS, C. R., FLEET, G. H., LEE, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal Enology and Viticulture.* 36, 302-313.

WIJSMAN, M. R., VAN DIJKEN, J. P., VAN KLEEFF, B. H. A., SCHEFFERS, W. A. (1984). Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custer effect). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 50, 183-19.

WIKEN, T., SCHEFFERS, W. A., VERHAAR, A. J. M. (1961). On the existence of a negative Pasteur effect in yeast classified in the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 27, 401-433.

WHITING, R. C., BAGI, L. K., (2002). Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 73 (2– 3), 291– 295.

WON, J. I., YANG, Y. I., KIM, B. G., CHOI, C. Y. (1993). Adaptative control of specific growth rate based on proton production in anaerobic fed-batch culture. *Biotechnology Letters*. 15-5. 511-516.

WRIGHT, J. M., PARLE, J. N. (1974). *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 17-2. 273-278.

Y

YANG, H. Y. (1973). Deacidification of grape musts with *Schizosaccharomyces pombe*. *American Journal Enology and Viticulture*. 24.

Z

ZWIETERING, M. H., DE WIT, J.C., CUPPERS, H. G. A. M., VAN'T RIET, K. (1994). Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 60-1, 204-213.

ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., VAN'T RIET, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1875– 1881.

ZWIETERING, M. H., ROMBOUTS, F. M., VAN'T RIET, K. (1992). Comparison of denitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *Journal of Applied Bacteriology*. 72, 139-145.

Annexes

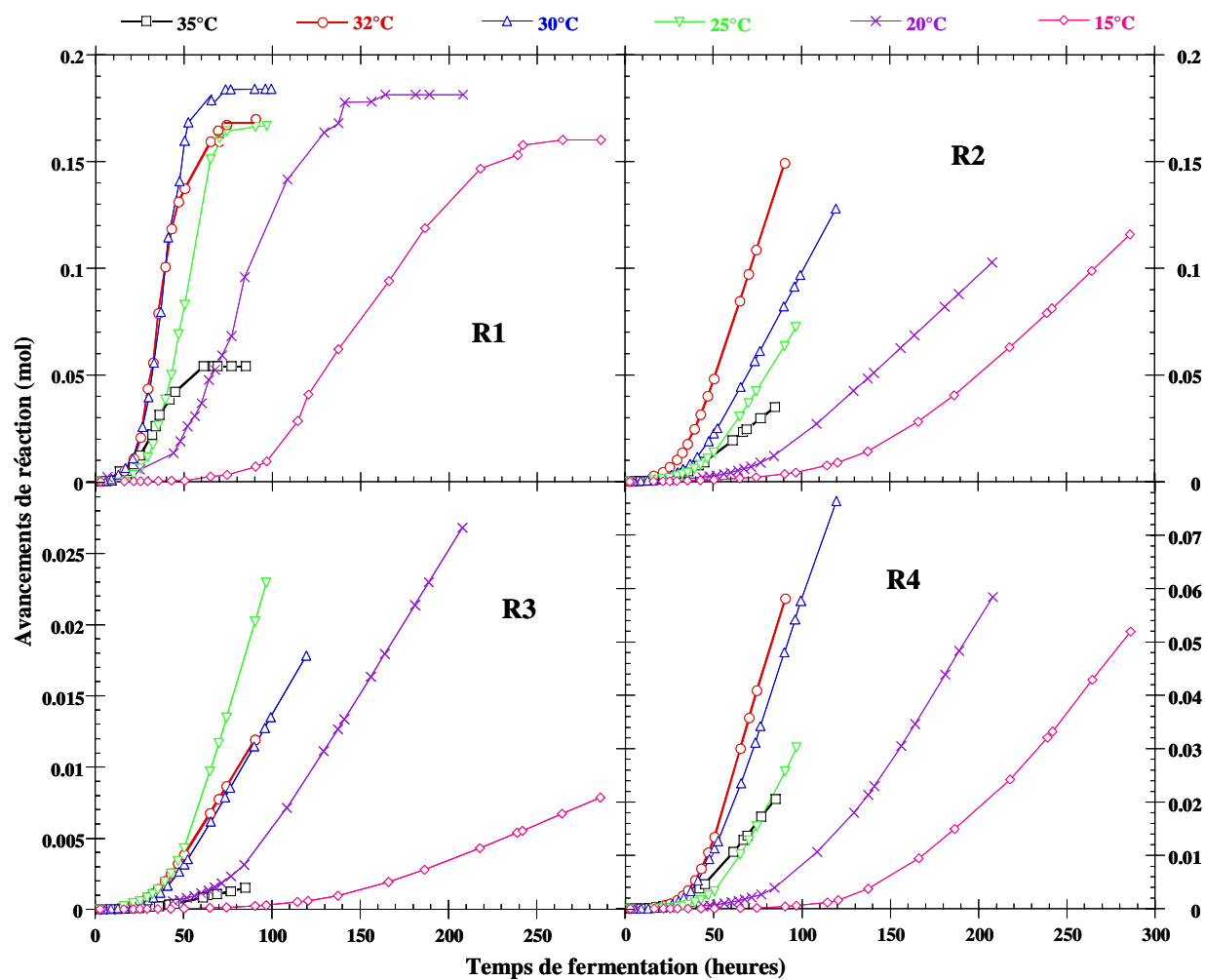


Figure 2.1. Comparaison des avancements de réactions obtenus à différentes températures souche *Brettanomyces distillerie* (B5d).

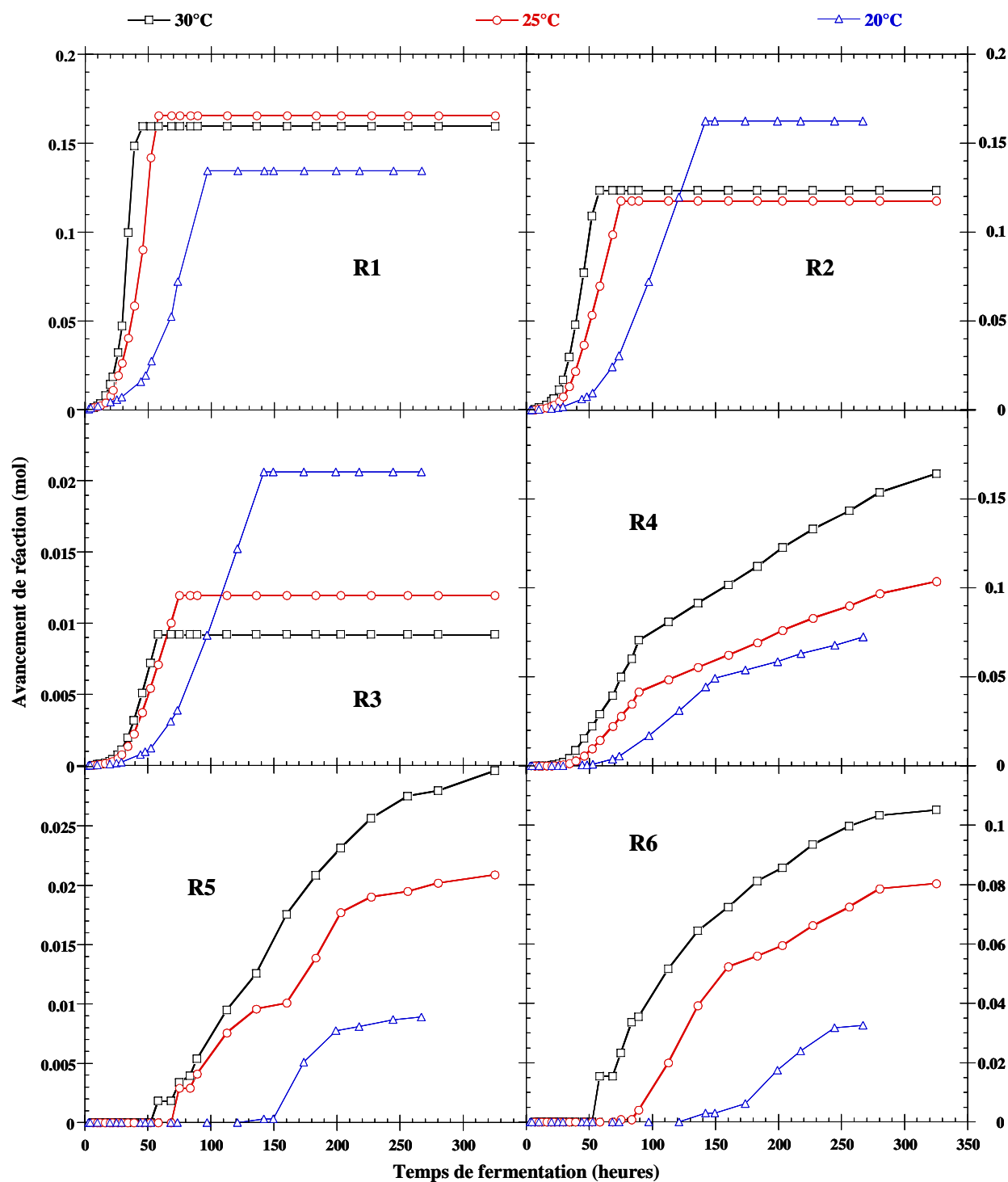


Figure 2.2. Comparaison des avancements de réactions obtenus à différentes températures souche *Brettanomyces vin* (B2).

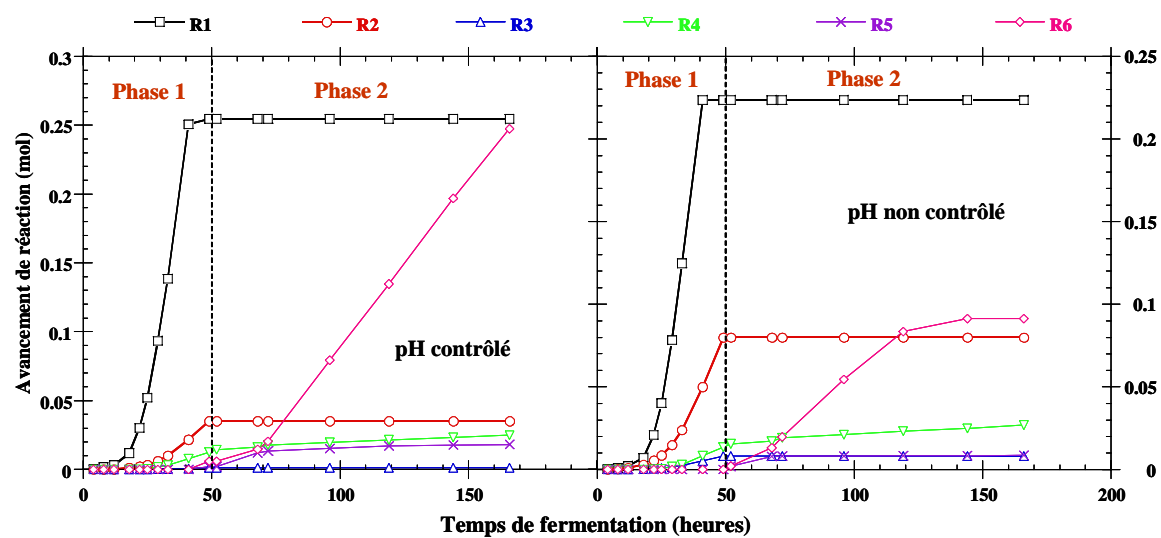


Figure 2.3. Comparaison des avancements de réactions obtenus à différentes conditions de pH souche *Brettanomyces distillerie* (B5d).

***Brettanomyces bruxellensis* :**
Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation.
Influence des facteurs environnementaux

RESUMÉ

Ce travail a porté sur l'analyse métabolique et cinétique de deux souches de *Brettanomyces*, levure de contamination des industries de fermentation alcoolique. Une des souches a été isolée d'une distillerie d'alcool de betterave, l'autre d'une unité de vinification. En s'appuyant sur la méthodologie des plans d'expérience, l'influence de facteurs de l'environnement de ces contextes industriels a été étudiée: pH, température, éthanol, dioxyde de soufre. Les cinétiques et stoechiométries observées ont pu être correctement représentées par un modèle associant loi logistique et formalisme de Luedeking et Piret. Les valeurs des paramètres du modèle de croissance sont fixées à partir des résultats du plan d'expérience. Enfin, par la méthode de l'analyse factorielle, nous avons pu proposer un schéma réactionnel valable pour les souches et les conditions opératoires testées.

Mots clefs :

Brettanomyces bruxellensis, métabolisme, cinétique, modélisation, température, pH, éthanol, SO₂.

ABSTRACT

This work has dealt with the metabolic and kinetic analyses of two strains of *Brettanomyces*, a contamination yeast found in alcoholic fermentation industries. One of these two strains was isolated from a beet alcohol distillery and the other one from a winemaking unit. Leaning upon the experimental plan methodology, the influence of the industrial environment factors has been studied: pH, temperature ethanol and sulphur dioxide concentration. The kinetics and stoichiometries observed were accurately represented by a model associating the Logistic law and Luedeking and Piret formalism. The parameters values of the growth model were settled from the experimental plan results. Finally, using the factorial analysis method, we were able to propose a reactional scheme valid for the tested strains and operative conditions.

Key words:

Brettanomyces bruxellensis, metabolism, kinetic, model, temperature, pH, ethanol, SO₂.